Aus dem Institut
für Pharmakognosie der Freien Universität Berlin
Direktor: Professor Dr. Rudolf Hänsel

Untersuchungen

über

Begleitstoffe in HELICHRYSUM - Arten

I N A U G U R A L - D I S S E R T A T I O N

zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Freien Universität Berlin

Vorgelegt von
Arthur Günther ALBRECHT
aus Pôrto Alegre/Brasilien

1962

Aus dem Institut
für Pharmakognosie der Freien Universität Berlin
Direktor: Professor Dr. Rudolf Hänsel

Untersuchungen

über

Begleitstoffe in HELICHRYSUM - Arten

I N A U G U R A L - D I S S E R T A T I O N

zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Freien Universität Berlin

Vorgelegt von
Arthur Günther ALBRECHT
aus Pôrto Alegre/Brasilien

Referent: Professor Dr. R. Hänsel
Korreferent: Professor Dr. G. Schenck

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

Tag der mündlichen Prüfung: 19.3.1962

Tag der Promotion: 25. Juli 1962

Meinem verstorbenen Vater
und
meiner lieben Mutter
in Dankbarkeit gewidmet.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546822_0012

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Pharmakognosie der Freien Universität Berlin unter der Leitung von Herrn Professor Dr. R. H ä n s e l durchgeführt.
Es sei mir gestattet, an dieser Stelle meinem verehrten Lehrer, Herrn Professor Dr. R. Hänsel, für sein großes Wohlwollen und die Förderung meiner Arbeit zu danken. Zu jeder Zeit war er bereit, mir in allen experimentellen Fragen und persönlichen Angelegenheiten behilflich zu sein.

Ferner danke ich recht herzlich der Kustodin Frau Dr. L. L a n g h a m m e r für Anregungen und Hinweise, die sie mir jederzeit gegeben hat. Die Durchführung dieser Arbeit wäre mir nicht möglich gewesen ohne ihren wertvollen Rat.

Herrn Professor Dr. G. S c h e n c k, Direktor des Pharmazeutischen Institutes, möchte ich ebenfalls meinen herzlichen Dank aussprechen, weil er mir durch eine Zwischenprüfung im Auftrage der Außenkommission der Freien Universität Berlin die Verlängerung meines Ford-Stipendiums ermöglicht hat; ich danke ihm auch für die Erlaubnis zur Benutzung der Bibliothek.

Durch Stipendien des Berliner Senats und des Ford-Komitees der Freien Universität Berlin war es mir finanziell möglich, diese wissenschaftliche Arbeit durchzuführen. Hierfür spreche ich meinen besten Dank aus.

Den brasilianischen Behörden sage ich ebenfalls meinen Dank; zunächst Herrn Professor Dr. E. PAGLIOLI, Rektor der Universität Rio Grande do Sul, der mir die notwendige Erlaubnis gab, meine Hilfsassistentenstelle für einige Monate zu unterbrechen; ferner der brasilianischen Regierung, die durch die Organisationen "Campanha Nacional de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nivel Superior" und "Conselho Nacional de Pesquisas" meine Arbeit durch finanzielle Hilfe unterstützt hat.

Allen denen, die sich in liebenswürdiger Weise um die Erfüllung meiner Wünsche bemühten, meinen herzlichen Dank auszusprechen, ist mir ein aufrichtiges Bedürfnis. - Mit ganz besonderer Herzlichkeit aber möchte ich nochmals meinem sehr verehrten Lehrer, Herrn Professor Dr. R. H ä n s e l , danken für seine großzügige Förderung, die er meiner Arbeit angedeihen ließ.

Inhaltsverzeichnis

Seite

A. Einleitung 6
Die Gattung Helichrysum und ihr nahestehende . .
Gattungen 6
Bisher vorliegende Untersuchungen 7
B. Hauptteil 12
Diskussion der Methodik 13
Extraktion des Pflanzenmaterials 19
Säulenchromatographische Trennung der Extrakte 19
1. Flavonglykoside in 21
a) Helichrysum arenarium 21
Isolierung von A_{10} und seine Identifizierung als Apigenin-7-glukosid 21
b) Helichrysum bracteatum 28
Identifizierung von B_7 als Luteolin-7-glukosid 28
2. Scopoletin in Helichrysum arenarium 34
Isolierung von A_8 und seine Identifizierung als Scopoletin 34
3. Substanz X in Helichrysum arenarium 38
Isolierung von A_9 und seine Charakterisierung 38
4. Ein Anthochlor-Pigment in Helichrysum bracteatum 44
Charakterisierung von B_9 44
C. Experimenteller Teil 49
Allgemeine Arbeitstechniken 50
Extraktion des Pflanzenmaterials 51
I. Helichrysum arenarium (L.) DC.. 51
Präparative Säulenchromatographie 51
1a) Isolierung einer stark blau fluoreszierenden Substanz (A_8= Scopoletin) 54

Seite

1b) Identifizierung von A_8 als Scopoletin 55

2) Isolierung einer weiteren sublimierbaren Substanz (= A_9) und deren Charakterisierung 58

3a) Isolierung von weißen Kristallnadeln (A_{10}=Apigenin-7-glukosid) 59

3b) Identifizierung von A_{10} als Apigenin-7-glukosid 61

4) Isolierung von A_7 und seine Identifizierung als Kämpferol-3-glukosid 66

II. Helichrysum bracteatum (VENT.)WILLD.var. monstrosum Hort.luteum 68

Säulenchromatographische Auftrennung des wäßrigen Extraktes der gelben Sorte von Helichrysum bracteatum 68

1) Identifizierung der gelben Kristallnadeln (B_7) als Luteolin-7-glukosid . . 68

2) Identifizierung der kleinen Kristallrosetten (B_9) als Auronderivat 77

D. Diskussion 83

E. Zusammenfassung 91

F. Literaturverzeichnis 92

A.) E i n l e i t u n g

Die Gattung Helichrysum und ihr nahestehende Gattungen

Helichrysum arenarium (L.) DC., die goldgelbe Sandstrohblume, wächst auf trockenem Sandboden und ist eine bekannte einheimische Art der Gattung Helichrysum. Die meisten Arten sind in Südafrika beheimatet; aber auch im tropischen Afrika, auf Madagaskar, in Europa, Asien und Australien ist die Gattung zahlreich vertreten. Die Heimat von Helichrysum bracteatum (VENT.) WILLD., der Garten-Strohblume, ist Australien.

In der Neuen Welt fehlt diese Gattung aus der Familie der Compositae (Tubuliflorae; Tribus: Inuleae; Subtribus: Gnaphalinae) völlig.
Hingegen treffen wir in Südamerika Arten zweier anderer Gattungen aus derselben Subtribus an: Gnaphalium cheiranthifolium LAM. sowie Achyrocline satureioides (LAM.) DC..

In unserem Kulturkreis zählt Helichrysum arenarium zum alten Arzneischatz der Volksmedizin.

Im Ergänzungsbuch zum Deutschen Arzneibuch (Erg.-B.VI) werden "die getrockneten, vor dem völligen Aufblühen gesammelten Trugdolden von Helichrysum arenarium DE CANDOLLE (Compositae)" als "Flores Stoechados-Ruhrkrautblüten" geführt.

Auf Madagaskar werden mehrere Helichrysum-Arten von den Einheimischen medizinisch verwendet.

In Südamerika spielt der sogenannte "Ostertee", marcela, eine ziemliche Rolle, der auch auf Märkten käuflich zu erwerben ist. Seine Stammpflanze ist Achyrocline satureioides, genannt marcela hembra (9)(50). Gnaphalium cheiranthifolium heißt marcela macho.

Da in so verschiedenen Gegenden der Erde diese nahe verwandten Pflanzen als Volksmittel gebraucht werden, schien es lohnend, sich mit dieser Pflanzengruppe etwas näher zu befassen.

Bisher vorliegende Untersuchungen.

Im Jahre 1884 hat schon A.ROSOLL (69) in Wien - einer Anregung J.WIESNERs folgend - die Blütenköpfchen von Helichrysum bracteatum WILLD. var.monstrosum "...behufs genauen Studiums des darin auftretenden eigenthümlichen Farbstoffes" untersucht.
Er beschreibt die lebhafte gelbe Farbe der Infloreszenzen. Er erwähnt ihre Verwendung zu Immortellenkränzen und den Brauch, - das erscheint mir wichtig - sie durch Eintauchen in eine angesäuerte Boraxlösung rubinrot zu färben. Als besonders interessant hebt er die Tatsache hervor, daß Mineralsäuren und Alkalien dieselben Farbreaktionen hervorbringen: eine purpurrote Färbung, die nach vorsichtigem Neutralisieren der Lösung wieder in Gelb übergeht. Metalloxyde und ihre Salze fällten den Farbstoff im alkoholischen Auszug mit roter Farbe. Dieselben Erscheinungen, bei geringerer Farbintensität, zeigten auch Helichrysum arenarium DC., außerdem die sogenannte französische Immortelle Helichrysum orientale L., die capensischen Strohblumen (H.foetidum CASS. und H.hebelepis DC.), darüberhinaus die gelbe Strandnelke (Statice Bonduelli Stestib.). ROSOLL konnte den gefundenen Farbstoff nur in Form einer amorphen, harzartig glänzenden, dunkelgelben Masse gewinnen. Natriumamalgam sowie schweflige Säure reduzierten den Körper in alkalischer Lösung (Entfärbung). ROSOLL nannte den von ihm gefundenen Farbstoff Helichrysin und kommt nach histochemischen Untersuchungen zu dem Schluß, daß er in den jüngeren Blättchen an das Plasma gebunden sei, in den älteren bei resorbiertem Zellinhalt in der Membran seinen Sitz habe.

G.KLEIN (47) fand diesen Farbstoff in lebendem Gewebe im Zellsaft, in totem in der Membran. KLEIN ordnet das Helichrysin ROSOLLs den Anthochlorpigmenten der Dahlia-Gruppe zu (48).

Pharmakologische Untersuchungen verschiedener Autoren (siehe in HEISE (38)) konnten eine cholagoge Wirkung der Flores Stoechados feststellen, auch zeigten sie sich in klinischen Versuchen wirksam als Mittel gegen Gallensteine und bei chronischer Gallenblasenentzündung. Durch diese Untersuchungen konnte die alte Ansicht der Volksmedizin experimentell belegt werden, daß die Heilpflanze "bei Gelbsucht", "bei Verstopfung der Leber", also als Choleretícum, wirksam sei. Nach GEßNER (28) ist sie vor allem bei chronischer Cholecystitis, nicht aber bei Icterus angezeigt. JERZMANOWSKA und GRZYBOWSKA (45) prüften angereicherte Drogenextrakte auf spasmolytische und cholagoge Wirksamkeit: Apigeninreiche Extrakte wirkten cholagog, ein Extrakt, der hauptsächlich Salipurposid und Kaempferol-3-glukosid enthielt, erwies sich als spasmolytisch und cholagog wirksam, wenn auch die cholagoge Wirksamkeit hierbei nur gering war.

Für die anderen Indikationen der Volksmedizin: "bei Wassersucht, bei Gicht, Hautkrankheiten, Verstopfungen, gegen Würmer, als Diureticum", darüber hinaus "als Mottenmittel" (37), liegen u.W. noch keine pharmakologischen oder klinischen Prüfungen vor.

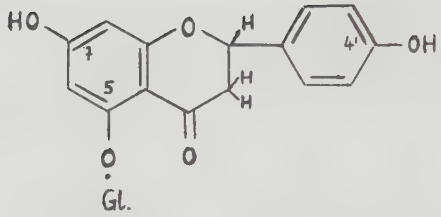
Phytochemisch war die Pflanze lange Zeit wenig untersucht worden. HOPPE (1958) (43) nennt als Inhaltsstoffe nur Bitterstoffe, Gerbstoff, ca. 0,04% aether.Oel, Harz, Phytosterin, Helichrysin (chinonartiger Farbstoff-Flavon). HEISE (38) zitiert als weitere in der einschlägigen Literatur genannte Verbindung noch einen Kohlenwasserstoff $C_{28}H_{58}$ mit dem Fp. 65°C. Im Jahre 1956 isolierte JERZMANOWSKA (38) einige glykosidische Inhaltsstoffe, denen Flavonolstruktur zugeschrieben wurde (38). 1960 bespricht dieselbe Autorin (45) drei kristalline Substanzen, und zwar Salipurposid, ein Naringenin-5-glukosid vom Schmelzpunkt 219-224°, Apigenin und Kaempferol-3-glukosid. 1959 gelang es HEISE, zwei bisher unbekannte Flavanonglykoside zu isolieren, welche er als

diastereomere Naringenin-5-ß-D-glukoside erkannte. HÄNSEL und HEISE (34) bezeichneten das Flavanon-glykosid, das sie als (-)-Naringenin-5-ß-D-glukosid identifizieren konnten, als Helichrysin A und als Helichrysin B ein partielles Razemat des (-)-Naringenin-5-ß-D-glukosids und des (+)-Naringenin-5-ß-D-glukosids.

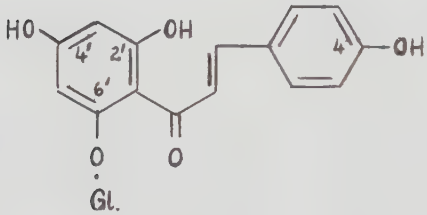
1960 isolierten HÄNSEL, PINKEWITZ, LANGHAMMER und HEISE (35) Isosalipurposid (2',4,4',6'-tetrahydroxychalkon-6'-glukosid), das gelbe Pigment von Helichrysum arenarium (siehe Name!), in kristalliner Form.

HEISE (38) war es trotz aller Bemühungen weder durch Säulenchromatographie (an Zellulosepulver und an Magnesol) noch durch präparative Papierchromatographie gelungen, außer den beiden genannten Flavanonglukosiden weitere Inhaltsstoffe in kristalliner Form zu isolieren. Auch selektive Extraktion mit verschiedenen organischen Lösungsmitteln blieb ohne Erfolg. Die guten Erfahrungen, die in unserem Institut bei der Isolierung des Isosalipurposids durch Chromatographie an einer Polyamidsäule (Versuchsprodukt PP 15 der BASF) nach den Angaben von R.NEU (56) gemacht worden waren, ließen hoffen, daß mit Hilfe dieser neuen Methodik sich die bisherigen Schwierigkeiten (der Isolierung weiterer Inhaltsstoffe in kristalliner Form) leichter meistern lassen würden.

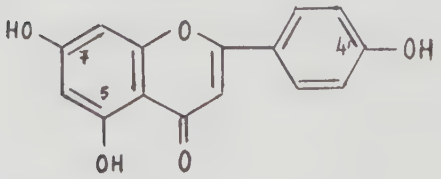
Faßt man die Ergebnisse der bisherigen phytochemischen Untersuchung zusammen, so wurden bisher in der Pflanze folgende Flavonoide gefunden:



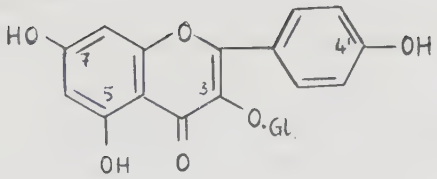
Naringenin-5-glukosid =
5,7,4'-trihydroxy-flavanon-5-glukosid



Isosalipurposid =
2',4,4',6'-tetrahydroxychalkon-6'-glukosid



Apigenin =
5,7,4'-trihydroxyflavon



Kaempferol-3-glukosid =
3,5.7.4'-tetrahydroxy-flavon-3-glukosid =
5,7,4'-trihydroxyflavonol-3-glukosid

Ein Vergleich der Formelbilder zeigt, daß diese Verbindungen nur verschiedene Oxydationsstufen desselben Grundgerüstes darstellen (worauf auch schon JERZMANOWSKA (45) hinwies, der allerdings das Vorkommen des dem Flavanonglykosid isomeren Chalkonkörpers noch unbekannt war).

Nach Beendigung meiner Versuche erhielt ich Kenntnis von einer Arbeit von VRKOČ et al. (79). Sie fassen ihre Ergebnisse wie folgt zusammen: " Die Autoren stellten neben weniger bemerkenswerten Stoffen auch die Anwesenheit von Campesterol und eines weiteren, bisher unbekannten Sterols, eines Sterolins und eines Diterpenalkohols fest. Weiters fanden sie drei farbige Substanzen von bisher nicht näher untersuchtem Charakter, die sich durch ihre Löslichkeit in Petrolaether von der Gruppe der identifizierten Flavonoidglykoside und deren freien Aglykonen (Salipurposid, Naringenin-5-diglucosid, Kempherol-3-diglukosid, Apigenin-glukosid, wahrscheinlich Isosalipurposid, freies Naringenin und Apigenin) unterscheiden. Schließlich wurden aus der Droge auch 5,7-Dihydroxyphtalid, sein 5-Methylderivat und 5-Methoxy-7-glukosylphthalid isoliert."

B. H A U P T T E I L

Diskussion der Methodik.

Die Zielsetzung der Arbeit - die Isolierung und Identifizierung von Begleitstoffen, deren Anteil an den Gesamtinhaltsstoffen oft nur gering ist - erforderte eine sehr eingehende Untersuchung des Pflanzenmaterials. Stoffe zu isolieren, die in der Pflanze in nur sehr geringer Konzentration vorliegen, bietet ganz besondere methodische Schwierigkeiten. Pflanzenauszüge stellen in der Regel ein sehr komplexes Stoffgemisch dar. Es war daher meine erste Aufgabe, Methoden zu finden, die eine möglichst weitgehende Auftrennung der Inhaltsstoffe der untersuchten Pflanze gestatten.

Für lipophile Stoffe stehen hierfür schon längere Zeit säulenchromatographische Trennverfahren zur Verfügung. Besonders schwierig gestaltete sich dagegen lange die Auftrennung phenolischer Körper. Einen bedeutenden Fortschritt brachten hier erst die Arbeiten von W.GRASSMANN et al. (30)(31). Er et al. untersuchten das Adsorptionsverhalten von Phenolen an Polyamiden; sie konnten ein chromatographisches Verfahren zur Trennung verschiedener Phenole ausarbeiten. Die durch Wasserstoffbrücken bewirkte Bindung von Phenolen und Carbonsäuren an Polyamide erfolgt nicht nur an der Oberfläche, sondern auch im Innern des Polymeren. Die Kapazität von Polyamidsäulen übertrifft daher die Beladungsfähigkeit anderer Adsorptionsmittel um das 100fache. Die Verteilung des phenolischen Körpers zwischen dem Laufmittel und dem Polymeren wird der Verteilung einer Substanz zwischen zwei flüssigen Phasen parallel gesetzt. Die Affinität zur CO-NH-Gruppierung in Polyamiden hängt in der Regel von der Zahl der phenolischen OH-Gruppen ab.

War es mit Hilfe dieser Arbeitstechnik möglich geworden, Pflanzeninhaltsstoffe in kristalliner Form zu isolieren, so

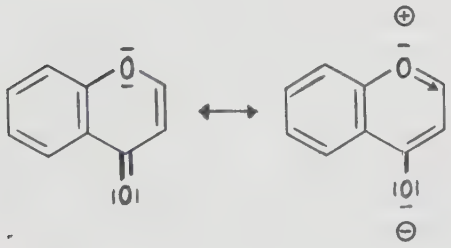
waren die so gewonnenen Substanzmengen der Begleitstoffe doch nur sehr gering. Die Identifizierung von pflanzlichen Nebenstoffen oder - falls es sich um Verbindungen handelt, die noch nicht beschrieben sind - deren Konstitutionsaufklärung bietet umsomehr Schwierigkeiten, je geringer die anfallende Substanzmenge ist. Glücklicherweise wurden auf dem Gebiet der phenolischen Pflanzeninhaltsbestandteile eine ganze Reihe von Mikromethoden entwickelt, wie z.B. Alkalispaltung im Mikromaßstab, Hydrolysen und papierchromatographischer Nachweis der Spaltprodukte, Farbreaktionen usw.. Klassische Beispiele für mikropräparative Abtrennungen und Identifizierungen von phenolischen Stoffen sind die Arbeiten von NORDSTRÖM und SWAIN (57-59), GEISSMAN (15-27) et al., auf die an dieser Stelle verwiesen sei. Besondere Bedeutung erlangte hierbei für mich u.a. die Absorptiometrie.

Es darf als bekannt vorausgesetzt werden, daß das UV-Absorptionsspektrum organischer Verbindungen abhängig ist von ihrer Konstitution. Die Lage der Absorptionsmaxima kann zur Identifizierung der Chromophore einer Verbindung dienen; hierbei ist unter "Chromophor" das konjugierte System einer Verbindung in seiner Gesamtheit zu verstehen. Substituenten, die einen bathochromen Effekt ausüben, werden Auxochrome genannt. Als Beispiel für die Heranziehung von UV-Absorptionsspektren für die Diskussion des Molekülbaues seien u.a. nur die Arbeiten von K.FREUDENBERG und G.SCHUHMACHER im Rahmen ihrer Ligninstudien genannt.

Auch für die Strukturaufklärung flavonoider Verbindungen leisten UV-Absorptionsmessungen gute Dienste.

Das Flavon-Grundgerüst ist durch zwei Banden erhöhter Absorption charakterisiert (Bande I im längerwelligen Spektralbereich, Bande II im kürzerwelligen Spektralbereich). Wie die Untersuchungen verschiedener Autoren (SKARZYNSKI (72), ARONOFF (1)) zeigen konnten,

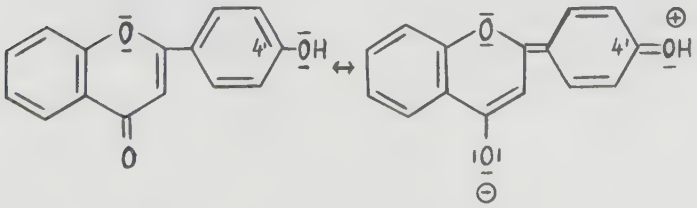
beeinflußt das Seitenphenyl das Spektrum nicht. Das Auftreten der zwei Absorptionsbanden des Flavonmoleküls bewirkt das Chromon-Gerüst, bzw. nach ARONOFF --- der die Antwort auf diese Frage noch präziser formuliert --- ist für das Auftreten der zwei Absorptionsbanden ein Sauerstoff am Phenon verantwortlich, der zur ortho- oder para-Resonanzbildung befähigt ist; im Falle des Chromon-Gerüstes könnte man sich das so vorstellen:



Das heißt mit anderen Worten: Es handelt sich um eine Mesomerie, hervorgerufen durch die Neigung des Ring-Sauerstoffs zum Übergang in den "Onium"-Zustand, unterstützt durch die "Aufrichtungstendenz" der Carbonylgruppe.

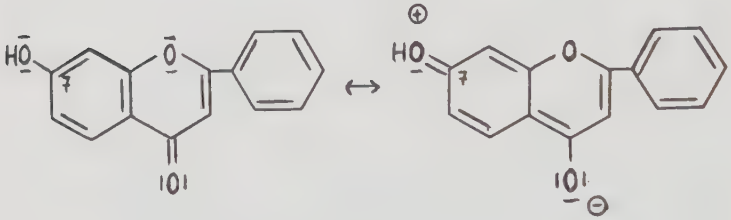
Ist das Flavon hydroxyliert, so treten die Hydroxylgruppen mit dem Carbonyl-Sauerstoff in Resonanz, d.h. die OH-Gruppe, die einsame Elektronenpaare besitzt (+E-Effekt), beteiligt sich durch elektromere Verschiebung an der Mesomerie.

Bei einer Hydroxylgruppe in 4'-Stellung würde das so aussehen:



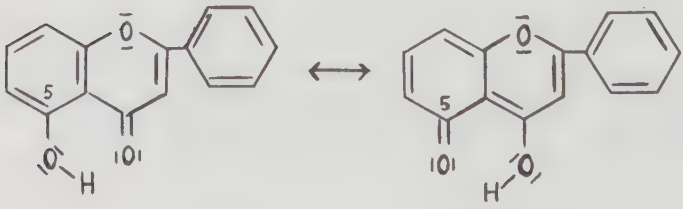
Die zusätzliche Mesomeriebeteiligung bewirkt eine viel stärkere Energieabsorption, die sich in einem großen bathochromen Effekt an Bande I äußert, wenn man das UV-Absorptionsspektrum der Substanz mißt. Methylierung der 4'-OH-gruppe in den Polyoxyflavonen bewirkt gewöhnlich eine hypsochrome Verschiebung der Bande I (72). Das würde darauf hindeuten, daß der +E-Effekt der Methoxy-gruppe in dieser Stellung kleiner ist als der der OH-gruppe.

Bei einer Hydroxylgruppe in 7-Stellung würde Mesomerie zwischen folgenden Grenzformen auftreten:



Bande I wird bathochrom verschoben. Methylierung der OH-gruppe in 7-Stellung verändert das Spektrum kaum. Dasselbe gilt für Glykosid-bildung an dieser Stelle.

Bei einer Hydroxylgruppe in 5-Stellung sehen die Grenzformen der Mesomerie so aus:



Hierbei kommt es zu einem bathochromen Effekt der Bande II (72).

Auch die Intensität der Lichtabsorption, der Extinktionsgrad, ist abhängig von der Molekülstruktur.

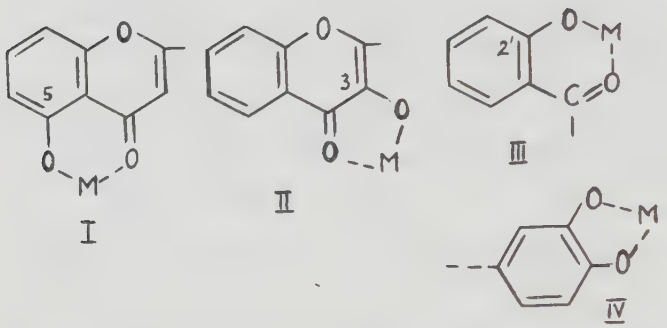
Der auxochrome Effekt wird, wie zu erwarten, verstärkt, wenn mehrere OH-Gruppen in das Flavonmolekül eingeführt werden.
Auffallend ist, daß zwei OH-Gruppen in 3',4'-Stellung auf das Absorptionsmaximum im kurzwelligeren Spektralbereich (Bande II) einen hypsochromen Effekt ausüben (72).

So gestatten UV-Absorptionsmessungen schon den einen oder anderen Rückschluß auf die mögliche Struktur einer flavonoiden Verbindung. Noch viel mehr über die Struktur einer Verbindung sagen UV-Absorptionsmessungen aus bei verschiedenem pH-Wert und nach Zugabe von Metallsalzen, da die Spektren durch pH-Erhöhung oder Metallsalze sehr unterschiedlich beeinflußt werden, je nachdem in welcher Stellung das Molekül freie Hydroxylgruppen trägt (72)(59)(51)(75)(22)(23)(78).

GEISSMAN (22) stellte mit Hilfe von UV-Absorptionsmessungen alkalischer Lösungen von flavonoiden Verbindungen folgendes fest: Waren OH-Gruppen im Molekül so lokalisiert, daß die Ausbildung einer Mesomerie mit der Carbonylgruppe begünstigt wurde, so erfuhren diese OH-Gruppen in alkalischem Medium eine auffallende Erhöhung ihres auxochromen Charakters.

SWAIN (75) führt die Größe von $\Delta \lambda$ auf das Ausmaß der Konjugation zurück; dafür spricht auch die Tatsache, daß Isoflavone, deren 3-Phenylgruppe mit dem Rest des Moleküls nicht konjugiert ist, nur eine kleine Verschiebung im Alkalischen aufweisen.

Die Bildung von Metallkomplexen ist an folgende Stellung von Hydroxylgruppen im Molekül gebunden:



I II III IV

Es handelt sich also um die o-Hydroxy-Carbonyl-Gruppierung (Beispiel: 5-Hydroxyflavone I, Flavonole II, 2'-Hydroxychalkone III) und die o-Dihydroxy-Gruppierung IV.

Experimentelle Untersuchungen der zitierten Autoren haben gezeigt, daß beispielsweise bereits die Basizität einer Natriumacetatlösung ausreicht, um -- bei Vorliegen einer freien OH-gruppe in 7-Stellung -- das im kürzerwelligen Spektralbereich liegende Absorptionsmaximum der Verbindung bathochrom zu verschieben (78). GEISSMAN erklärt diese Beobachtung durch eine stärkere Ionisation des C_7-Hydroxyls gegenüber dem C_4,-Hydroxyl (23). Unter diesen Versuchsbedingungen bewirken zwei ortho-ständige Hydroxygruppen ebenfalls eine bathochrome Verschiebung, nun aber des längerwelligen Absorptionsmaximums. Zugabe von Borsäure zu der Natriumacetat-haltigen Lösung läßt den bathochromen Effekt kleiner werden (Bildung eines Metallkomplexes), wenngleich immer noch eine Verschiebung zum Langwelligen hin bestehen bleibt (75)(78). Aluminiumchlorid wiederum bewirkt, der Meßlösung zugesetzt, eine sehr starke bathochrome Verschiebung des Spektrums, wenn sich die Verbindung

durch eine freie Hydroxylgruppe in Ortho-Stellung zu einer Carbonylgruppe, also beispielsweise in 5-Stellung, auszeichnet. Trägt hingegen ein flavonoider Körper sowohl in 3- als auch gleichzeitig in 4'-Stellung freie Hydroxylgruppen, so kommt es in Natriummethylatlösung zu einem Verschwinden des Absorptionsmaximums im längerwelligen Spektralbereich (Zersetzung der Substanz). 4'-Hydroxylierung löst unter diesen Versuchsbedingungen bathochrome Verschiebung der I. Bande aus (59).

Extraktion des Pflanzenmaterials.

Nach einer Vorextraktion mit Petrolaether - zur Entfernung lipophiler Stoffe - wurden die Blütenköpfe mit Aceton erschöpfend extrahiert. Die Acetonextrakte engte ich bis zur Trokkene ein und nahm den Rückstand mit heißem Wasser auf. Nach Klären und Filtrieren wurden diese wäßrigen Pflanzenauszüge mit Hilfe der präparativen Säulenchromatographie weiterverarbeitet.

Säulenchromatographische Trennung der Extrakte.

Der Drogenextrakt der gelben Sorte von Helichrysum bracteatum wurde durch einmalige präparative Chromatographie an einer Polyamidsäule in zahlreiche Eluate aufgegliedert (Siehe Abb.9, Seite 69 !). Nach Einengen im Vakuum und Stehen im Eisschrank bildeten die Eluate der Zonen 7 und 9 kristalline Niederschläge, die einer näheren Prüfung unterzogen wurden. Der Niederschlag von Zone 7 (=B7) bestand (nach dem Umkristallisieren aus verdünntem Methanol) aus gelben Kristallnadeln, der Niederschlag von Zone 9 (=B9) aus kleinen gelben Kristallrosetten, die sich später orangerot verfärbten.

Der Drogenextrakt von Helichrysum arenarium wurde von mir zuerst über eine große Polyamidsäule geschickt. Im Tageslicht hatten sich deutlich drei Zonen ausgebildet, wie schon

früher beschrieben (35). Im UV-Licht folgten - von oben nach unten - einem schmalen orangefarbenen Rand eine breite dunkle rotbraune Zone (Chalkon-Zone;(35)), anschließend eine bläulich-helle Zone, die von einer dunklen Mischzone gefolgt wurde, die aus mehreren schmalen hellen und dunklen Bändern bestand; die Endzone war im UV-Licht blau. Diese Säule wurde nun nicht eluiert, sondern ich zerschnitt das beladene Polyamid-Adsorbens in die einzelnen Zonen. Anschließend erfolgte deren Auftrennung an weiteren Polyamidsäulen. Nach Einengen der fraktioniert gesammelten Eluate fielen vier Stoffe (A_1 , A_2 , A_4 , A_{10}) kristallin aus; die Isolierung von drei weiteren (A_3 , A_8 , A_9) gelang erst, wie später beschrieben, nach zahlreichen Arbeitsschritten.

Von den bereits in der Literatur beschriebenen Verbindungen wurden aus Helichrysum arenarium in kristalliner Form isoliert:

A_1 = Helichrysin A (Schmp.159°C) = (-)-Naringenin-5-ß-D-glukosid
A_2 = Helichrysin B (Schmp.227°C) = partielles Racemat
A_3 = Helichrysin (Schmp.245°C) = (+)-Naringenin-5-ß-D-glukosid+)
A_4 = Isosalipurposid = 2',4,4',6'-tetrahydroxychalkon-6'-glukosid
A_5 = Kohlenwasserstoff (Schmp.60-63°C);(wahrscheinlich als Gemisch vorliegend)

Papierchromatographisch wurden nachgewiesen:

A_6 = Apigenin
A_7 = Kämpferol-3-glukosid

Neu gefunden und in reiner kristalliner Form dargestellt wurden:

A_8 = Scopoletin
A_9 = Substanz X
A_{10} = Apigenin-7-glukosid

+) Siehe Dissertation G.PINKEWITZ (in Vorbereitung)

1. Flavonglykoside in

a) Helichrysum arenarium

Isolierung von A_{10} und seine Identifizierung als Apigenin-7-glukosid.

Wurde das Eluat einer im UV-Licht dunkel erscheinenden Zone (Siehe den Versuchsteil Abb.8,Zone 8!) einer Polyamidsäule im Vakuum eingeengt, so fielen schon während des Einengens - bedingt durch die sinkende Alkoholkonzentration - in Wasser schwer lösliche feine weißliche Nadeln aus (= A_{10}).

Ihr Schmelzpunkt lag bei 220°C.

Bei der Reduktionsprobe nach SHINODA (71) färbte sich die Lösung orange. Dieser Ausfall der Reaktion deutete auf das Vorliegen eines flavonoiden Körpers.

Der positive Ausfall der Anthron-Reaktion (11) ließ vermuten, daß die Substanz in Glykosidform vorliegt.

Die Reaktion nach TAUBÖCK (33) verlief negativ. Die Substanz trug also in 3-Stellung keine freie Hydroxylgruppe.

Die Grünfärbung mit Eisen-III-chlorid zeigte eine Metallkomplexbildung an. Auf Seite 18 ist formelmäßig dargestellt, welche Hydroxylgruppen in Flavonoidmolekülen zur Metallkomplexbildung befähigt sind. Nach H.HENECKA (Chemie der Beta-Dicarbonylverbindungen, Berlin 1950) bildet Eisentrichlorid in alkoholischer Lösung mit ß-Enolen gefärbte Chelate. Die Konfiguration eines ß-Enols ist bei flavonoiden Körpern gegeben, wenn sie eine OH-Gruppe in 5-Stellung tragen oder in 3-Stellung. Komplexbildung mit Eisen tritt auch ein, wenn eine ortho-Dihydroxy-gruppierung (z.B. am Seitenphenyl) vorliegt (40).

Die mit Natriumazetat abgepufferte Lösung der reduzierten Substanz (40) gab keine positive Eisenchloridreaktion. Da durch die Reduktion die Carbonylgruppe der Flavonoide am C_4 fortfällt, muß die Metallkomplexbildung der nicht reduzierten Substanz durch

eine ortho-Hydroxycarbonylgruppierung bedingt gewesen sein. Bei gleichzeitigem Vorliegen einer negativen TAUBÖCK-Reaktion kommt hierfür nur noch eine Hydroxylgruppe in 5-Stellung des Moleküls in Frage.

Das Papierchromatogramm zeigte einen im UV-Licht dunkelockerfarbenen Fleck (15%ige Essigsäure: Rf = 0,22).

Die Messung des Absorptionsspektrums der Verbindung im UV-Bereich ergab folgende Werte:

$\lambda_{Max.}$ 335; 268 ($\lg E_{spez.}$ 1,669 ; 1,605)

$\lambda_{Min.}$ 291; 247 ($\lg E_{spez.}$ 1,32 ; 1,19)

In der Literatur findet man entsprechende Werte angegeben bei verschiedenen Apigeninderivaten, z.B.:

$\lambda_{Max.}$ 335, 270 für Apigenin (51),

$\lambda_{Max.}$ 340; 265 für Apigenin (22),

$\lambda_{Max.}$ 334; 270 für Apigenin-4'-glukosid (51),

$\lambda_{Max.}$ 334; 268 für Apigenin-7-glukosid (51).

Diese Übereinstimmung der UV-Spektren regte zu der Arbeitshypothese an, in der vorliegenden Substanz ein Apigeninderivat zu vermuten.

Aus den in der Literatur genannten Zahlen geht weiter hervor, daß der Flavonoidanteil der einzige Chromophorträger ist, daß also der Zuckeranteil der Glykoside nichts zur Absorption beiträgt. Bei diesem Sachverhalt muß es möglich sein, von der Größe der Extinktion auf die Größe des Molekulargewichtes zu schließen.

Der Berechnung des ungefähren Molekulargewichtes wurde die Formel

$$\text{Molekulargewicht} \times E_{\text{speziell}} = \text{konstant}$$

$$\text{Molekulargewicht} = \frac{K}{E_{\text{speziell}}}$$

zugrunde gelegt.
Für Apigenin(Aglykon) werden (22) folgende Werte angegeben:

$$\lambda_{\text{Max.}} 340 \; ; \; 265 \; (\lg \varepsilon_{\text{molar}} \; 4{,}31 \; ; \; 4{,}25)$$

Setzte ich diese Werte von $\lg \varepsilon_{\text{molar}}$ als Konstanten in die obige Gleichung ein neben der speziellen Extinktion der Substanz bei den entsprechenden Wellenlängen, so errechnete ich ein Molekulargewicht von 447.
Die Größenordnung dieses Wertes sprach für das Vorliegen eines Apigeninmonoglukosides.

Der errechnete Wert für ein Apigenin-monoglukosid ist 433.

Für das Vorliegen eines Monoglykosids sprechen ferner die von A_{10} und seinem Aglykon errechneten R_M-Werte (siehe (2)!):

	R_M
authent. Apigenin	- 1,05
Aglykon von A_{10}	- 1,05
A_{10}	- 0,30
Apigeninmonoglukosid	- 0,30
Apigenindiglukosid (berechnet)	+ 0,49

Voraussetzung für die Möglichkeit einer solchen Aussage sind folgende Tatsachen:
Die Papierchromatographie ist in erster Linie ein Verteilungsverfahren. Infolgedessen hat der von der Struktur einer Verbindung abhängige Verteilungskoeffizient Einfluß auf die Größe des Rf-Wertes.

Dadurch wird aber auch der Rf-Wert struktur-abhängig.

BATE-SMITH und WESTALL (2) zeigen Gesetzmäßigkeiten auf, nach welchen die Größe des Rf-Wertes von der Natur und Anzahl der Substituenten abhängig ist:
Man erhält eine Gerade, wenn man $\log(\frac{1}{Rf} - 1) = R_M$ gegen die Anzahl gleicher Substituenten aufträgt.

Anschließend beobachtete ich die Veränderung des Absorptionsspektrums im UV-Bereich im alkalischen Milieu (0,002 M Natriummethylat). Die Absorptionsmaxima zeigten eine Verschiebung zum Langwelligen hin, und zwar lag das I.Maximum bei 390 mμ ($\lg E_{spez.} = 1{,}87$), das II.Maximum bei 265, bzw. 256 mμ ($\lg E_{spez.} = 1{,}585$).
Diese Meßwerte stellte ich den Angaben gegenüber, mit denen in der Literatur verschiedene Apigeninderivate charakterisiert sind (57)(51). Es ist in diesem Zusammenhang nämlich bemerkenswert, daß die Stellung der Substituenten im Apigenin-molekül - also beispielsweise in unserem Falle die Anheftungsstelle des Zuckerrestes - den Verlauf des UV-Spektrums im alkalischen Bereich ganz wesentlich beeinflußt. Während die Absorptionskurven von Apigenin und seinen Derivaten in neutralem Medium einander äußerst ähneln, tritt in alkalischem Medium eine starke Differenzierung auf. MANSFIELD, SWAIN und NORDSTRÖM (51) lenkten die Aufmerksamkeit auf diese Eigentümlichkeit und nutzten sie zur Diagnose bei Verbindungen, deren Konstitutionsaufklärung mittels klassischer chemischer Methoden nicht möglich ist, da zu geringe Substanzmengen zur Verfügung stehen. Die genannten Autoren beobachten den bathochromen, bzw. hypsochromen Effekt der pH-Erhöhung. Darüberhinaus setzen sie die "optische Dichte" (=Extinktion) des ersten Absorptionsmaximum im Neutralen gleich 100 und drücken dann die optischen Dichten der anderen Maxima in Prozentzahlen aus. Tabelle 1 stellt meine Meßwerte den in der Literatur (51)(57) niedergelegten Meßwerten von Apigenin-7-glukosid und Apigenin-4'-glukosid gegenüber. (Die zitierten Autoren verwendeten als

Lösungsmittel Aethanol, bzw. 0,002 M Natriumaethylat; ich löste meine Substanz in Methanol, bzw. Natriummethylat).

	I. Bande				II. Bande			
	Methanol		Na-methylat		Methanol		Na-methylat	
	λ max. [mμ]	D [%]	λ max. [mμ]	D [%]	λ max. [mμ]	D [%]	λ max. [mμ]	D [%]
A_{10}	335	100	390	159	268	86	265	84
Apigenin 7-glukosid n.(51)	335	100	398	148	268	87	269	82
Apigenin-4'-glukosid n.(51)	334	100	391	107	270	102	275	123

	I. Bande		II. Bande	
	$\Delta\lambda$	Δ D [%]	$\Delta\lambda$	Δ D [%]
A_{10}	55	+ 59	- 3	- 2
Apigenin-7-glukosid n.(51)	63	+ 48	+ 1	- 5
Apigenin-7-glukusid n.(57)	63	+ 66	+ 1	-20
Apigenin-4'-glukosid n.(51)	57	+ 7	+ 5	+21

Tabelle 1

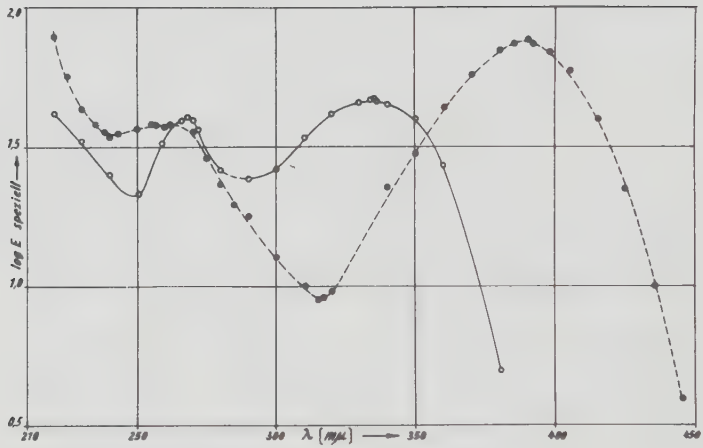


Abb.1: UV-Absorptionskurven von A_{10}=Apigenin-7-glukosid isoliert aus Helichrysum arenarium

o = methanolische Lösung

• = +Natriummethylat (0,002 molar in Methanol)

Unsere Spektren (s.Abb.1) zeigten große Ähnlichkeit mit den in der Literatur angegebenen Zahlen für Apigenin-7-glukosid.

Auch der beobachtete Farbumschlag des Reduktionsproduktes der Verbindung bei Erhöhung des pH-Wertes im Anschluß an die Reaktion von SHINODA (71) nach violettrosa sprach für eine freie Hydroxylgruppe in 4'-Stellung, also gegen ein 4'-Glykosid (40).

Durch die Eisenchloridreaktion war bereits ein Hinweis auf das Vorliegen einer freien Hydroxylgruppe in 5-Stellung erbracht worden (Siehe S. 22!).

Die Stellung des Zuckerrestes am C-Atom 7 wurde aber auch noch nachgewiesen durch Besprühen des Papierchromatogramms mit Echtschwarz K[+]. Die Reaktion fiel negativ aus. Nach NEU (54) (55) reagieren Flavonglykoside mit in 7-Stellung befindlichem Zucker- oder Polyoxysäurerest mit stabilen Diazoniumsalzen nicht durch Farbstoffbildung, während Flavone mit in 5- und 7-Stellung freien Hydroxylgruppen unter kräftiger Farbstoffbildung reagieren.

Die Hydrolyse lieferte den nächsten Beweis für die Identität unserer Substanz mit Apigenin-7-glukosid. Aus den Angaben der Literatur (36) geht hervor, daß bei der Säurehydrolyse auch mit der Möglichkeit einer sekundären Veränderung der Zuckerkomponente gerechnet werden muß. Daher wählte ich für den Nachweis des Zuckeranteils milde Hydrolysebedingungen, wie sie im Versuchsteil näher beschrieben sind, obwohl ich mehreren Angaben der Literatur (41) entnahm, daß einigen Flavonglykosiden mit einer Zuckersubstitution am C_7 eine verringerte Hydrolysegeschwindigkeit eigen ist. In einem Parallelversuch wurde Apigenin-7-glukosid den gleichen Versuchsbedingungen unterworfen. Die gereinigten und neutralisierten Zuckerlösungen wurden papierchromato-

---

+) Diazotiertes 4-Amino-3,6-dimethoxy-4'-nitro-azobenzol Serumvertrieb Marburg GmbH.

graphisch verglichen. Die Rf-Werte beider Zucker stimmten in vier verschiedenen Laufmitteln überein.
Bei diesen milden Hydrolysebedingungen bestand der ungelöste Niederschlag - wie eine papierchromatographische Prüfung ergab - noch z.T. aus ungelöstem Glykosid neben Aglykon. Um das Aglykon nachzuweisen wurde das Glykosid nochmals einer energischeren Hydrolyse unterworfen (siehe Versuchsteil!). Das abfiltrierte Aglykon war papierchromatographisch mit authentischem Apigenin identisch.

Des weiteren wurde A_{10} mit authentischem Apigenin-7-glukosid papierchromatographisch verglichen: Beide Substanzen zeigten in fünf verschiedenen Laufmitteln die gleichen Rf-Werte.

Nach all diesen Versuchsergebnissen (Schmelzpunkt, Farbreaktionen, UV-Spektrum, Molekulargewicht, R_M-Werte, Hydrolyse, Papierchromatographie) betrachte ich A_{10} als identisch mit Apigenin-7-glukosid.

VRKOČ et al. (79) nennen als Inhaltsstoff ein Apigeninglucosid vom Schmp.247-248°C und mit folgendem UV-spektrum:

$\lambda_{Max.}$ 336 ; 261 ($lg\varepsilon_{molar}$ 4,325 ; 4,315 ; 4,241).

Über die Anheftungsstelle des Zuckers werden von den Autoren keine Angaben gemacht.

b) Helichrysum bracteatum

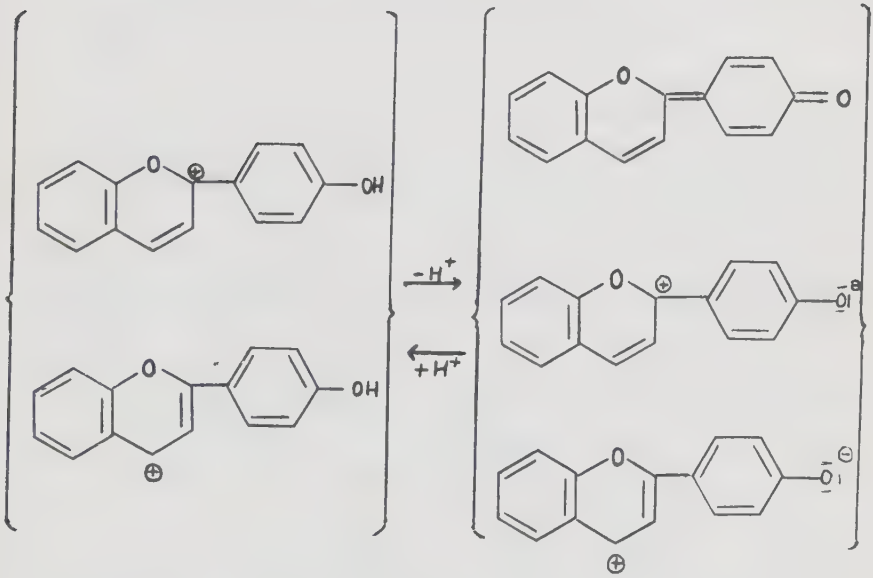
Identifizierung von B_7 als Luteolin-7-glukosid.

Der Schmelzpunkt der gelben Kristallnädelchen lag bei 248 - 252°C.

Bei der Reduktionsprobe nach SHINODA (71) färbte sich die Lösung lachsrot. Dieser Ausfall der Reaktion deutete auf einen flavonoiden Körper.

Der positive Ausfall der Anthron-Reaktion (11) ließ vermuten, daß die Substanz in Glykosidform vorliegt.

Der Farbumschlag der reduzierten Lösung bei Erhöhung des pH-Wertes (Zugabe von Natriumbikarbonat) nach (violett-) blau sprach für das Vorliegen einer freien Hydroxylgruppe in 4'-Stellung. Diese Reaktion beruht (nach HÖRHAMMER und HÄNSEL (39) wohl auf einer Umlagerung der Carbeniumform mit benzoidem Seitenphenyl in die Phenolatform mit chinoidem Seitenphenyl:



Bei der vorliegenden Substanz beobachtete ich eine stärkere Farbtiefe, als bei der Untersuchung des Apigenin-7-glukosids nach dieser Methode: das deutete an, daß die untersuchte Substanz über mehr auxochrome Hydroxylgruppen verfügt.

Die blauviolette Färbung der mit Natriumacetat abgepufferten reduzierten Lösung nach Zugabe von Eisen-III-chlorid sprach für das Vorliegen einer ortho-Dihydroxy-gruppierung am Seitenphenyl, die zur Komplexbildung mit dem $Fe^{\bullet\bullet\bullet}$ befähigt ist (40). Wird die Eisen-III-chlorid-Probe mit den Reduktionsprodukten von Flavonkörpern durchgeführt, so ist der positive Ausfall der Reaktion eindeutiger, da durch den Fortfall der

Ketogruppe in C_4 eine Komplexbildung des $Fe^{\cdot\cdot\cdot}$ mit diesem Sauerstoff und einer ihm benachbarten Hydroxylgruppe wegfällt. (Siehe die Diskussion dieser Frage auf S. 21 !)

Das UV-Absorptionsspektrum von B_7 zeigte folgende Werte:

$\lambda_{Max.}$ 350 ; 256 (lg $E_{spez.}$ 1,602 ; 1,566)

$\lambda_{Min.}$ 295 ; 236 (lg $E_{spez.}$ 1,256 ; 1,446)

Beim Literaturstudium fiel mir auf, daß Luteolin ein ähnliches Spektrum aufweist (22). Ich legte daher meinen weiteren Untersuchungen die Arbeitshypothese zu Grunde, meine Substanz könnte ein Luteolin-Derivat sein.

Diese Vermutung bestätigte die Alkalispaltung, bei der ich als Spaltprodukte Phloroglucin und Protocatechusäure nachweisen konnte.

In analoger Weise wie bei Apigenin-7-glukosid auf Seite 23 errechnete ich das ungefähre Molekulargewicht von B_7:

$$\text{Molekulargewicht} \times E_{\text{speziell}} = \text{konstant}$$

$$\text{Molekulargewicht} = \frac{K}{E_{\text{speziell}}}$$

Für Luteolin sind (22) folgende Werte des UV-Spektrums angegeben:

$\lambda_{Max.}$ 355 ; 258 (lg ε_{molar} 4,28 ; 4,22)

Ausgehend vom Wert lg ε_{molar} = 4,22 als Konstante und der gemessenen speziellen Extinktion von B_7 bei der Wellenlänge 256 mμ (2.Maximum) errechnete ich ein Molekulargewicht von 451.
Die Größenordnung dieses Wertes sprach für das Vorliegen eines Luteolin-monoglykosides.
Der errechnete Wert für ein Luteolin-monoglukosid ist 448.

Das nächste Ziel war, die Stellung des Zuckerrestes zu

bestimmen.

Erhielt ich die erste Arbeitshypothese aufrecht, daß ein Luteolinderivat vorliege, so standen für die Glykosidbindung die Hydroxylgruppen in 3'-,4'-,5- und 7-stellung zur Diskussion. Zur Klärung dieser Frage zog ich die Absorptiometrie heran. Die theoretischen Grundlagen dieses Vorgehens habe ich auf den Seiten 14 - 19 erörtert. Meine Meßergebnisse sind in Tabelle 2 zusammengefaßt.

	I. Bande			II. Bande		
	$\lambda_{Max.}$ [mμ]	$\Delta\lambda$ [mμ]	E[%]	$\lambda_{Max.}$ [mμ]	$\Delta\lambda$ [mμ]	E[%]
Methanol	350	--	100	256	--	92
+Na-acetat	405	+55	98	260	+ 4	77
+Na-acetat +Borsäure	373	+23	118	259	+ 3	162
$+AlCl_3$	431	+81	148	275 334	+19 +79	119 30
Na-Methylat	404	+54	133	230 261	+ 5	105

Tabelle 2

Eine kritische Auswertung der Messungen läßt nach dem vorher Gesagten folgende Aussagen über die Konstitution der vorliegenden Verbindung zu:

1.) In 7-Stellung des Flavongrundgerüstes befindet sich keine freie Hydroxylgruppe. Es wurde keine bathochrome Verschiebung der II. Bande in Gegenwart von Natriumacetat beobachtet.

2.) Zwei freie Hydroxylgruppen stehen in Orthostellung zueinander (die erste Bande des Spektrums wird in Gegenwart von Natriumacetat und Borsäure um nur $\Delta \lambda = 23$ mμ verschoben); es besteht Verdacht auf eine 3'-4'-Dihydroxygruppierung, die zur Borkomplexbildung befähigt ist.

3.) Die Verbindung besitzt eine freie Hydroxylgruppe in 5-Stellung (es wurde eine bathochrome Verschiebung der I.Bande um $\Delta \lambda = 81$ mμ in Gegenwart von Aluminiumchlorid beobachtet).

4.) Hydroxylgruppen in 3- und 4'-Stellung sind nebeneinander nicht vorhanden. In Gegenwart von Natriummethylat verschwindet die I. Bande nicht, sondern es tritt ein starker bathochromer Effekt auf. Diese Beobachtung deutet auf eine freie OH-Gruppe in 4'-Stellung des Moleküls.

All diese Aussagen würden der Arbeitshypothese von dem Vorliegen eines Luteolin-7-glukosides nicht widersprechen.

Nach den schon früher im Zusammenhang mit der Untersuchung von Apigenin-7-glukosid zitierten Arbeiten von NEU (54) war bei einem 7-Glukosid zu erwarten, daß mit Echtschwarz K auf dem Papierchromatogramm keine Reaktion einträte. NEU (54) gibt an: "...alle Flavone, die in 7-Stellung einen Zuckerrest enthalten, reagieren mit den Diazoverbindungen nicht; wahrscheinlich handelt es sich um eine sterische Hinderung des Eintritts des Diazosubstituenten in den Benzolkern. Dagegen geben die Aglykone kräftige Farben". Von den von NEU geprüften Substanzen gibt beispielsweise Apigenin = 5,7,4'-trihydroxyflavon mit Echtschwarz K eine kräftige

Blaufärbung, Diosmetin = 5,7,3'-trihydroxy-4'-methoxy-flavon eine Blaufärbung, Diosmin, das entsprechende 7-Rhamnoglukosid, reagiert nicht. Luteolin = 5,7,3',4'-tetrahydroxyflavon gibt mit Echtschwarz K eine kräftige Braunfärbung; ein 7-Glykosid des Luteolins wurde von NEU nicht untersucht.

Interessant war nun meine folgende Beobachtung: Ein Papierchromatogramm von B_7 (auf dem als Testsubstanz auf das Reagenz Apigenin mitgelaufen war) zeigte nach dem Besprühen mit einer 0,5%igen wäßrigen Lösung von Echtschwarz K zunächst nur, wie erwartet, an der Stelle des Apigenin einen schwach blauen Fleck; nach dem Trocknen des Chromatogramms war der Apigeninfleck kräftig blau geworden, aber auch der Fleck von B_7 zeigte eine ockergelb-bräunliche Farbe; diese Beobachtung stellte zunächst nach der oben zitierten Literatur das Vorliegen eines 7-Glykosids in Frage. Zu weiterer Prüfung fertigte ich in verschiedenen Laufmitteln Papierchromatogramme an, auf die B_7 im Wechsel mit authentischem Luteolin-7-glukosid aufgetragen war. Wie die Tabelle 10 (S.S.76) zeigt, erwiesen sich beide Substanzen als völlig identisch. Auch authentisches Luteolin-7-glukosid zeigte nach dem Besprühen mit Echtschwarz K nach dem Trocknen einen ockergelb-bräunlichen Fleck. Luteolin-7-glukosid stellt also eine Ausnahme von der oben beschriebenen Regel dar. Die Beobachtungen von NEU an Diosmin zeigen weiter: Methylierung des 4'-Hydroxyls im Luteolin-7-glykosidmolekül hebt diese veränderte Reaktionsfähigkeit auf.

[Diosmetin, also das 5,7,3'-trihydroxy-4'-methoxyaglykon bildet eine schwächere Blaufärbung aus als das 5,7,4'-trihydroxy-aglykon. (Es entsteht in beiden Fällen dieselbe Farbe. Das 5,7,3',4'-Tetrahydroxy-aglykon Luteolin bildet eine andere Farbe.) Demnach scheint eine Methylierung der Hydroxylgruppe den Einfluß dieser Gruppe auf die Konjugation des Moleküls stark zu verändern, wie das auch schon in anderem Zusammenhang bei UV-Absorptionsmessungen festgestellt wurde (22)(75)(51)(59).]

Diese Versuchsergebnisse machen es meiner Ansicht nach

unwahrscheinlich, daß das Ausbleiben der Farbstoffbildung mit Echtschwarz K bei Flavonen, die in 7-Stellung einen Zuckerrest enthalten, auf eine sterische Hinderung des Eintritts des Diazosubstituenten in den Benzolkern zurückzuführen ist. Dieser Faktor würde bei Luteolin-7-glukosid in Wegfall kommen.

2. Scopoletin in Helichrysum arenarium

Isolierung von A_8 und seine Identifizierung als Scopoletin.

Die weitere Auftrennung der Zone, die bei der Vortrennung unterhalb der Chalkonzone lag (35), zeigt Abb. 7 (Siehe Versuchsteil). Hierbei fiel besonders die stark blau fluoreszierende Zone 1 auf.

Da - Siehe die Diskussion dieser Frage auf Seite 84! - enge Beziehungen zwischen der Biosynthese von Zimtsäuren, Cumarinen und Flavonoiden bestehen, zum anderen aber eine blaue Fluoreszenz im UV-Licht sowohl bei Pflanzensäuren als auch bei Cumarinen häufig auftritt, interessierte mich die Substanz, welche für die an der Säule beobachteten blauen Fluoreszenzerscheinungen verantwortlich war.

Beim Eindampfen des Eluates aus Zone 1 fielen Kristalle aus; sie stellten aber nicht die fluoreszierende Substanz dar. Die blau fluoreszierende Substanz war in Lösung geblieben. Ihre Isolierung gelang schließlich durch Ausschütteln mit Chloroform und fraktionierte Kristallisation aus Essigester (Siehe Versuchsteil!). Das Kristallisat zeigte im Papierchromatogramm aber noch einen weiteren Fleck. Der blau fluoreszierende Fleck verhielt sich auf dem Papierchromatogramm wie authentisches Scopoletin. Das UV-Spektrum der Kristalle war mit Scopoletin nicht identisch. Es fehlte vor allem das erste Maximum und Minimum des Scopoletins.

Nun kam mir folgende Beobachtung zu Hilfe: während reines Scopoletin erst ab 137°C zu sublimieren begann, sublimierte das Kristallgemisch bereits ab 120°C. Bei Vorversuchen mit einem Acetonextrakt aus 100 g Flores Stoechados hatte ich bereits früher eine sublimierbare reine Substanz (= X) in die Hand bekommen, deren Identität wegen der winzigen Menge nicht zu ermitteln war. Ihr UV-Spektrum zeigte folgende Maxima und Minima (siehe Abb.2).

$\lambda_{Max.}$ = 218, 255, 292 mμ

$\lambda_{Min.}$ = 234, 274 mμ

In alkalischer Lösung erfuhr das Spektrum eine Verschiebung zum Langwelligen hin.

Ich verglich nun dieses Spektrum mit dem Scopoletin-Spektrum und kam dabei auf die Idee, ob nicht das von mir gemessene Spektrum (s.oben!) dadurch zustande gekommen war, daß die Spektren von Scopoletin und der bereits früher isolierten Substanz X einander z.T. kompensierten; war diese Arbeitshypothese richtig, so bestand der Niederschlag der Essigesterlösung aus einem Gemisch von Scopoletin mit der Substanz X. Da letztere bereits bei einer niedrigeren Temperatur zu sublimieren beginnt als Scopoletin, so mußte eine Trennung durch fraktionierte Sublimation möglich sein. Das Experiment bestätigte die Richtigkeit meiner Arbeitshypothesen: Das UV-Spektrum des so isolierten Sublimates hatte die gleichen Maxima wie die bereits früher isolierte Substanz X, zeigte auf dem Papierchromatogramm den gleichen Rf-Wert neben ganz geringer Verunreinigung mit Scopoletin und auch den gleichen Schmelzpunkt: 179°C. Der Sublimationsrückstand war von gelblicher Farbe. Er wurde anschließend bei 137-150°C sublimiert. Sein UV-Spektrum deckte sich mit dem des Scopoletins. Siehe Abb.3. Der Mischschmelzpunkt mit Scopoletin betrug 204,5-205,5°, zeigte also keine Depression. Somit war die Identität von A_8 mit Scopoletin bewiesen.

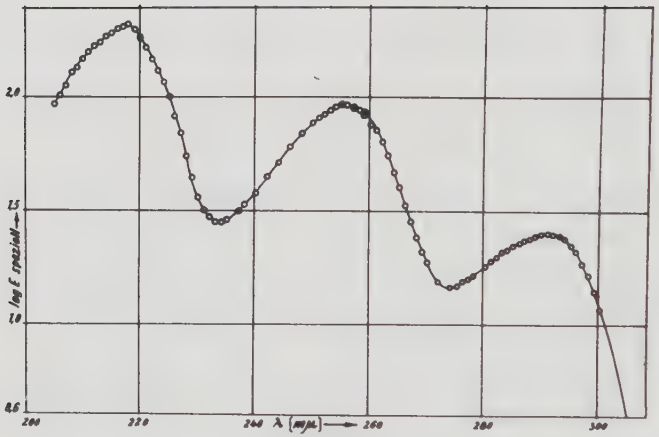


Abb. 2: UV-Absorptionskurve der Substanz X aus Helichrysum arenarium (s.S. 35)

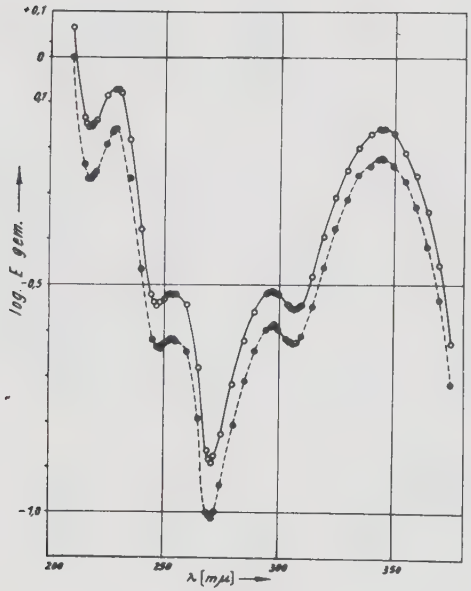


Abb. 3: UV-Absorptionskurven von Scopoletin
o = isoliert aus Helichrysum arenarium
• = authentische Vergleichsprobe

3. Substanz X in Helichrysum arenarium

Isolierung von A_9 und seine Charakterisierung.

A_9 war durch fraktionierte Sublimation (Siehe Seite 35) von dem Scopoletin abgetrennt worden. Es begann bei einer Temperatur von 120°C zu sublimieren. Sein Schmelzpunkt lag bei 179 - 181°C. Auf Papierchromatogrammen war A_9 weder im Tageslicht noch im UV-Licht sichtbar. Nur im kurzwelligen UV-Licht (Purinlampe) gab es sich als dunkelblauer Fleck zu erkennen. Im Laufmittel Eisessig-Wasser (15:85) betrug sein Rf-Wert 0,75, in 10%iger Essigsäure 0,67. Ammoniakdämpfe (oder Besprühen mit alkoholischer Kalilauge) verstärkten etwas die dunkelblaue Farbe des Papierchromatogramms unter der Purinlampe. Behandlung mit diazotiertem p-Nitranilin färbte den Chromatogrammfleck orangerot. Nach Besprühen des Chromatogramms mit Anilin-Glukose kam es zu keiner positiven Reaktion (Prüfung auf Säure).

UV-Absorptionsmessungen:

Das UV-Absorptionsspektrum zeigte folgende Maxima und Minima:

$$\lambda_{\text{Max.}}\ 218;255;292\ [m\mu]$$

$$\lambda_{\text{Min.}}\ 234\ ;\ \ 274\ [m\mu]$$

Diesen Versuchsergebnissen zufolge ist A_9 keine Pflanzen-Säure, kein Flavon oder Flavonol, kein Cumarinderivat. Freie OH-Gruppen scheinen vorzuliegen.

Ich konnte nur winzige Mengen an A_9 in reiner kristalliner Form isolieren; daher waren weitere Experimente mit dem Ziel einer Strukturaufklärung nach einer klassischen Methode leider nicht durchführbar.

Um trotz der geringen Substanzmengen einen gewissen Einblick in die mögliche Konstitution der Verbindung zu erhalten,

wurde ihre UV-Absorption gemessen sowohl nach Erhöhung des pH-Wertes der Meßlösung als auch nach Zugabe von Metallsalzen.

In vorliegendem Zusammenhang möchte ich vor allem auf Arbeiten von T.SWAIN verweisen (75), der an über 200 phenolischen Körpern das Verhalten ihrer UV-Spektren unter verschiedenen Bedingungen studiert hat. Es resultiert aus diesen Arbeiten, daß die Größe von $\Delta\ \lambda$, also der Verschiebung des Spektrums, abhängig ist vom Ausmaß der Konjugation des Moleküls. Eine bathochrome Verschiebung des Spektrums durch Aluminiumchlorid basiert in erster Linie auf dem bekannten chelatbildenden Effekt von Aluminium mit der ortho-Hydroxycarbonylgruppe. Konjugierte ortho-Dihydroxygruppierungen vermehren diesen Effekt. Verbindungen, die ortho-Dihydroxyphenol-gruppen - konjugiert mit einer Carbonylgruppe oder einem anderen Chromophor - im Molekül aufweisen, zeigen eine schwache bathochrome Verschiebung des Spektrums nach Zugabe von Aluminiumchlorid. SWAIN stellt weiterhin fest: " We have found, that the presence of ortho-dihydroxy groupings may be demonstrated spectroscopically in all compounds, except those, in which the group is isolated from the main chromophore such as flavanones and flavanonols, by a hypsochromic shift of the $\lambda_{Max.}$ of the compound in 0,002 M-sodium ethoxide solution on addition of an equivalent of boric acid". Hierbei wäre dieser Effekt nicht ausgelöst durch eine durch den Borsäurezusatz bedingte pH-senkung. Hieraus wird der Schluß gezogen, daß der Boratkomplex ein anderes Maximum hat als das Phenolation.

Des weiteren sei noch auf eine Arbeit von L.JURD verwiesen (46), in der diskutiert wird, daß die Spektrenverschiebungen unter dem Einfluß von Natriumaethylat und Aluminiumchlorid allein zu wenig spezifische Aussagen ermöglichen, so daß der Autor den Einfluß von Borsäure und Natriumazetat auf die Spektren verschiedener Flavonoide

prüft, die in der Natur häufig vorkommende Gruppierungen tragen, wie etwa o-Dihydroxy, o-Hydroxymethoxy und o-Hydroxycarbonyl-gruppen. Die Untersuchungen zeigen, daß die Gegenwart von Borsäure und Natriumacetat nur bei Verbindungen mit einer o-Dihydroxylverbindung eine bathochrome Verschiebung des Spektrums bewirkt. In Übereinstimmung mit den Arbeiten von SWAIN wird gefunden, daß die bathochrome Verschiebung des Spektrums bei diesen Verbindungen in Natriummethylatlösung größer ist als in Natriummetaboratlösung, während bei Verbindungen ohne eine o-Dihydroxygruppierung der Effekt in beiden Lösungen gleich groß ist.

Das Ergebnis meiner Messungen zeigt Tabelle 3 und die Abb.4-6.

	I. Bande		II.Bande		III.Bande	
	$\lambda_{Max.}$ [mμ]	$\Delta\lambda$ [mμ]	$\lambda_{Max.}$ [mμ]	$\Delta\lambda$ [mμ]	$\lambda_{Max.}$ [mμ]	$\Delta\lambda$ [mμ]
Methanol	292	--	255	--	217	--
+Na-acetat	322	+30	260	+ 5	234	+17
+Na-acetat +Borsäure	294	+ 2	258	+ 3	234	+17
+ $AlCl_3$	320	+28	270	+15	223	+ 6
Na-Methylat	320	+28	257	+ 2	229	+12

Tab. 3

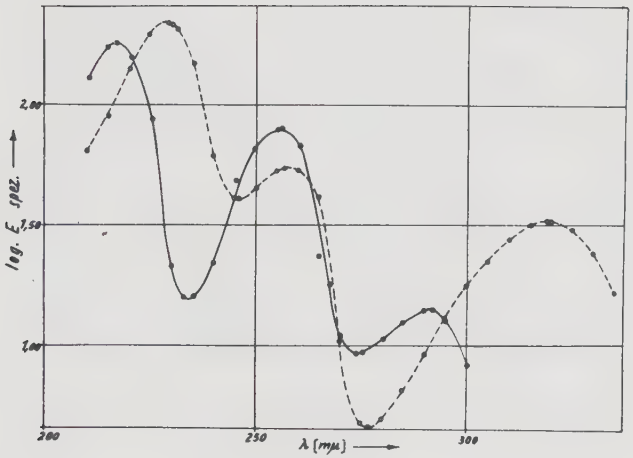


Abb. 4: UV-Absorptionskurven von A_9

• = methanolische Lösung

o = +Natriummethylat

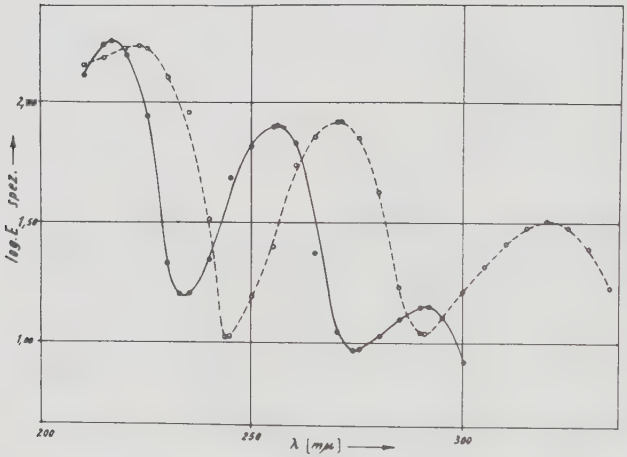


Abb. 5: UV-Absorptionskurven von A_9

. = methanolische Lösung

o = +Aluminiumchlorid (0,5 %ig in Methanol)

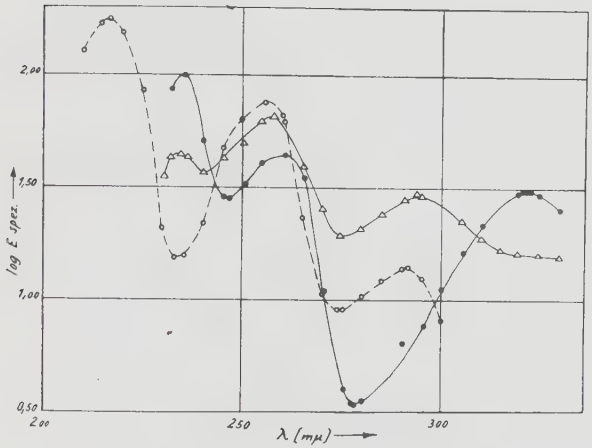


Abb. 6: UV-Absorptionskurven von A_9

o = methanolische Lösung

. = +Natriumacetat (wasserfrei gesättigt in Methanol)

Δ = +Natriumacetat (gesättigt) + Borsäure (1 %ig in Methanol)

Diese Versuchsergebnisse erlauben folgende Schlußfolgerungen: Der in alkalischer Lösung beobachtete bathochrome Effekt deutet auf eine Erhöhung des auxochromen Charakters von im Molekül vorliegenden Hydroxylgruppen und läßt eine erhöhte Konjugation vermuten. Die bathochrome Verschiebung der Banden in Gegenwart von Aluminiumchlorid zeigt eine Metallkomplexbildung entweder mit einer ortho-Hydroxycarbonylgruppe oder mit einer ortho-Dihydroxygruppe an, die mit einer chromophoren Gruppe in Konjugation steht. Die durch Natriumacetat allein ausgelöste bathochrome Verschiebung der I.Bande wird nach Zugabe von Borsäure weitgehend aufgehoben. Die vorher zitierten Beobachtungen von SWAIN lassen daher den Schluß zu, daß die Hydroxylgruppen, die im alkalischen Bereich eine bathochrome Verschiebung des Spektrums bewirkten, mit der Borsäure einen Metallkomplex bilden, dessen Maximum tiefer liegt.

Es ist nicht ausgeschlossen, daß für die beobachtete Metallkomplexbildung die ortho-Hydroxycarbonylgruppe des 5-Methoxy-7-hydroxyphthalids verantwortlich ist, das von VRKOČ et al. (79) aus der Pflanze isoliert wurde. Diese Autoren bezeichnen die Absorptionsbanden der genannten Verbindung bei 292 mμ (log 3,627) und 256 mμ (log 4,154) als typisch für das Phthalid-Chromophor. W.A.SCHROEDER et al. (Analytic.Chem. 23, 1740 (1951)) geben für Phthalid hingegen folgende Werte an: $\lambda_{Max.}$ 280; 273; 227; $\lambda_{Min.}$ 277; 249 - 250 mμ.

4. Ein Anthochlor+)- Pigment in Helichrysum bracteatum

Charakterisierung von B_9.

Der Schmelzpunkt der kleinen gelben Kristallrosetten, die sich orangerot verfärbten, war unscharf (Zersetzung ab 245°C).

Die intensive Rotfärbung der Substanz mit konzentrierter Schwefelsäure deutete auf ein Anthochlor-Pigment. Ebenso die Färbung mit Alkali.

+) Die neuere Literatur (15) versteht unter dieser Sammelbezeichnung (im Gegensatz zu früher) Chalkon- und Auronderivate. Siehe auch (47)(48)!

Die Reduktionsprobe nach SHINODA (71) verlief negativ.

Der positive Ausfall der Eisenchloridreaktion deutete - wie schon in den Ausführungen auf Seite 21 näher begründet wurde - auf das Vorliegen einer o-Hydroxycarbonylgruppierung oder einer o-Dihydroxygruppierung im Molekül.

Die Anthronreaktion war nicht durchführbar; wie oben beschrieben, gibt die Substanz selbst mit konzentrierter Schwefelsäure eine intensive Rotfärbung, die das Beobachten jeder weiteren eventuell auftretenden Färbung unmöglich macht.

Sucht man nach einem anderen Anhaltspunkt zur Beantwortung der Frage, ob es sich möglicherweise um eine glykosidische Substanz handeln könnte, so läßt die Größe der ermittelten Rf-Werte (siehe Tab.11 im Versuchsteil) die Vermutung zu, daß die Substanz als Glykosid vorliegt.

Das Ergebnis der UV-Absorptionsmessungen zeigt Tabelle 4:

	I. Bande		II. Bande	
	$\lambda_{Max.}$ [mμ]	$\Delta\lambda$ [mμ]	$\lambda_{Max.}$ [mμ]	$\Delta\lambda$ [mμ]
Methanol	409	---	259	---
+Na-acetat	instabil (329)(415)			
+Na-acetat +Borsäure	430	+ 21	267	+ 8
+ $AlCl_3$	325 434	+ 25	269	+10
+Na-Methylat	instabil (460)	(+ 51)	(270)	(+11)

Tab. 4

Die Meßergebnisse lassen folgendes ablesen:

1.) Die Lage der Maxima spricht nicht gegen das Vorliegen eines Aurons.

2.) In Gegenwart von Natriumacetat bildet sich die Inflexion vor Bande I zu einem neuen selbständigen Maximum aus (329 mμ). Die Extinktionshöhe der Bande I ist wesentlich verringert.

3.) UV-Absorptionsmessungen in alkalischer Lösung zeigten ein Absinken der Extinktionswerte in Abhängigkeit von der Zeit: die Substanz erfährt im alkalischen Bereich eine langsame Zersetzung. Nach Angaben der Literatur sind Aurone in alkalischem Milieu instabil, die eine oder mehrere ortho-Dihydroxy-gruppierungen aufweisen.

4.) In Gegenwart von Aluminiumchlorid entsteht ebenfalls ein neues Maximum bei 325 mμ. Die bathochrome Verschiebung der I. Bande in Gegenwart von Aluminiumchlorid und auch in Gegenwart von Natriumacetat-Borsäure (mit Natriumacetat allein keine bathochrome Verschiebung) zeigt eine Metallkomplexbildung an. Das könnte auf eine OH-Gruppe in 4-Stellung (also eine o-Hydroxycarbonylgruppe) hinweisen, eventuell auch auf eine o-Dihydroxygruppierung.

5.) Die bathochrome Verschiebung der I.Bande in Gegenwart von Natriummethylat deutet auf eine OH-Gruppe in 4'-Stellung (allerdings instabil).

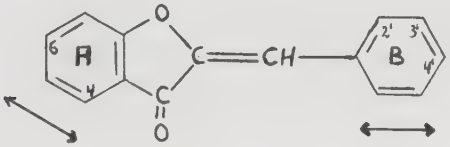
6.) Das Spektrum entspricht keinem der bisher in der Literatur beschriebenen Aurone, bzw. Auronglykoside.

7.) Das nach der Größe der Extinktion für einen Auronkörper geschätzte Molekulargewicht spricht für das Vorliegen eines Glykosids, schließt daher das Vorliegen des Aglykons irgendeines Auronderivates aus.

Aurone weisen eine in der Literatur als "crossed conjugation" bezeichnete Erscheinung auf: Sie sind in der Lage, zwei einander entgegengesetzte Mesomeriesysteme auszubilden, und zwar

a) Carbonylgruppe - Ring A - Konjugation
b) Carbonylgruppe - Ring B - Konjugation.

Nach welcher der beiden Seiten hin der Schwerpunkt verschoben wird, hängt von dem Einfluß verschiedener Substituenten ab.



Substitution in 6-Stellung verschiebt das Hauptmaximum hypsochrom. Substitution in 4-Stellung, in 2'-Stellung und in 4'-Stellung verschiebt das Hauptmaximum bathochrom. Substitution in 3'-Stellung allein ist von geringem Einfluß.

Bei allen Auronglykosiden sind die Maxima gegenüber den Aglykonen um 4 - 6 mμ bathochrom verschoben.

Der positive Ausfall des GIBBS-Testes beweist, daß die 7-Stellung des Moleküls unbesetzt ist.

Die Alkalispaltung der Substanz führte zu Phloroglucin und einer weiteren, noch nicht identifizierten Substanz (Siehe Tabelle 12 im Versuchsteil!). Das beweist, daß Ring A in 4- und 6-Stellung substituiert ist. Die schwere Hydrolysierbarkeit der Substanz legt die Vermutung nahe, daß der Zuckerrest in 6-Stellung angeheftet ist.

Papierchromatographisch konnte im Hydrolysat Glukose nachgewiesen werden. Das papierchromatographische Verhalten des Aglykons zeigt Tabelle 13.

Die Absorptionsmessungen (Aglykon)(s.Tab.14!) zeigen folgendes:

1.) Nach Zugabe von Na-acetat nimmt die Absorptionskurve einen sehr flachen Verlauf (niedrige Extinktion, keine scharf ausgeprägten Maxima).
2.) Nach Zugabe von Borsäure weist das Hauptmaximum einen sehr hohen Extinktionswert auf.

3.) Aluminiumchlorid bewirkt eine sehr starke bathochrome Verschiebung.

4.) Der Einfluß von Natriummethylat ist - gegenüber dem Glykosid - kaum verändert.

Die winzigen Substanzmengen reichten nicht aus, um noch weitere Experimente, wie z.B. Azetylierung, Azetylgruppenbestimmung, Methylierung, Molekulargewichtsbestimmung und CH-Bestimmung durchzuführen. Die Untersuchungen werden erst nach Isolierung größerer Substanzmengen von anderer Seite wieder aufgenommen.

C. Experimenteller Teil

Allgemeine Arbeitstechniken:

Alle Schmelzpunkte wurden mit einem Heiztischmikroskop der Fa.LEITZ durchgeführt.

Papierchromatographische Technik

Für die Papierchromatographie wurde Papier der Firma SCHLEICHER und SCHÜLL Nr. 2043 bM verwendet.

Chromatographiert wurde nach der aufsteigenden Methode in Entwicklungskammern aus Glas, wobei die Papiere zu Zylindern geformt waren. Die verschiedenen Lösungsmittelgemische, die als Laufmittel Verwendung fanden, sind bei den einzelnen Versuchen genannt; ebenso die Sprüh-Reagenzien für verschiedene Nachweisreaktionen.

UV - Analysenlampen

Als UV-Lichtquellen benutzte ich:
Quarzlampe HANAU und Klein-UV-Analysenlampe PULA. Das von dieser sogenannten Purinlampe erzeugte UV-Licht hat hauptsächlich eine Wellenlänge von 254 mμ (weiterhin im Text bezeichnet als "kurzwelliges UV-Licht").

UV-Absorptionsmessungen

Die Extinktionswerte der Substanzen wurden in Methanol p.a. (MERCK) in Quarzküvetten mit der Schichtdicke 1 cm mit einem Spektralphotometer der Fa.Carl ZEISS PM Q II gemessen.

Bei der graphischen Auswertung der Meßergebnisse wurde folgendermaßen vorgegangen:
aufgetragen wurde $\lg \varepsilon_{molar}[cm^2 Millimol^{-1}]$, $\lg E_{speziell}$ $[cm^2 \cdot mg^{-1}]$ gegen die Wellenlänge [mμ] oder,
sofern die Konzentration nicht bekannt war, $\lg E_{gem.}$ gegen die Wellenlänge [mμ] = $\lg E_{rel.}$.

Das Einengen von Lösungen erfolgte in Vakuumeindampfgeräten oder, bei größeren Mengen, in einem Umlaufverdampfer.

Extraktion des Pflanzenmaterials.

Blütenköpfe von Helichrysum arenarium wurden mit Petrolaether extrahiert. Der Drogenrückstand wurde anschließend mit Aceton extrahiert. Der von der Droge getrennte Acetonextrakt wurde zur Trockene eingeengt und mit der dem Drogengewicht entsprechenden Menge heißen Wassers aufgenommen.

Nach Klären und Filtrieren ließ ich diesen wäßrigen Extrakt noch einige Tage stehen; während dieser Zeit bildete sich ein kristalliner Bodensatz, der anderweitig weiterverarbeitet wurde. Er bestand zum größten Teil aus Helichrysin (38). Von mir wurde das klare wäßrige Filtrat mit Hilfe der präparativen Säulenchromatographie aufgetrennt.

Blütenköpfe einer gelben Sorte von Helichrysum bracteatum wurden erst mit Petrolaether im Soxhlet vorextrahiert, anschließend mit Aceton extrahiert. Das Aceton wurde bis zur Trockene abdestilliert und der Rückstand mit dem Drogengewicht an heißem Wasser aufgenommen.

I. Helichrysum arenarium (L.) DC.

Präparative Säulenchromatographie.

Eine Säule von 5 cm lichter Weite wurde in einer Höhe von 50 cm mit dem Versuchsprodukt PP 15 Sp der BASF gefüllt. Zu diesem Zweck wurde das Polyamidpulver (Perlon) mit destilliertem Wasser eingeschlämmt und die Säule mit 50%igem Methanol, zum Schluß wieder mit destilliertem Wasser, gewaschen. Um das Aufwirbeln des Perlonpulvers zu verhindern, wurde es mit einer 1/2 cm hohen Schicht von Seesand bedeckt. Diese Säule wurde mit 2 Litern des wäßrigen Filtrates (des Drogenextraktes aus Helichrysum arenarium) beschickt. Danach waren die Pflanzenstoffe in der oberen Hälfte der Säule adsorbiert. Mit 50%igem Methanol wurden sie soweit auseinandergezogen, bis nur noch die

untersten 5 cm der Säule frei waren.
Im Tageslicht hatten sich deutlich drei Zonen ausgebildet, wie schon früher beschrieben (35). Im UV-Licht folgten - von oben nach unten - einem schmalen orangefarbenen Rand eine breite dunkle rotbraune Zone (Chalkon-Zone;(35)), anschließend eine bläulich-helle Zone, die von einer Mischzone gefolgt wurde, die aus mehreren schmalen hellen und dunklen Bändern bestand, die Endzone war im UV-Licht blau.

Nach dieser groben Vortrennung des Pflanzenextraktes wurde die feuchte Perlon-"Wurst" mit Wasserdruck aus der Säule herausgepreßt und mit einem Messer in die verschiedenfarbigen Zonen zerschnitten. Jede dieser Zonen wurde nun für sich durch erneute Chromatographie an einer Perlonsäule weiter getrennt. - Ich ging dabei so vor, daß ich jeweils in eine Säule Perlon-Pulver mit Wasser einschlämmte, mit einer dünnen Schicht Seesand bedeckte und die so beschickte Säule mit 50%igem Methanol wusch; auf die Seesandschicht gab ich eine Aufschwemmung der jeweils aufzutrennenden Zone (aus der zerschnittenen ersten Säule) in nicht zu hoher Schicht, bedeckte erneut mit Seesand (um ein zu starkes Aufwirbeln des Pulvers zu verhindern) und eluierte mit 50 %igem Methanol. Das Eluat der jeweiligen Zone mußte so die ganze Perlonsäule passieren und trennte sich dabei in eine Anzahl neuer Zonen auf, die im UV-Licht zu erkennen waren. Darüberhinaus wurde der Trennvorgang papierchromatographisch verfolgt. Für grob orientierende Versuche wurde als Laufmittel das System Eisessig-Wasser (15:85) verwendet. Die Papierchromatogramme zeigten, daß bei Verwendung der beschriebenen präparativen Säulenchromatographie zwar in den meisten Fällen keine vollständige Trennung erreicht werden konnte, das Stoffgemisch aber doch schon eine weitgehende Aufgliederung erfahren hatte.

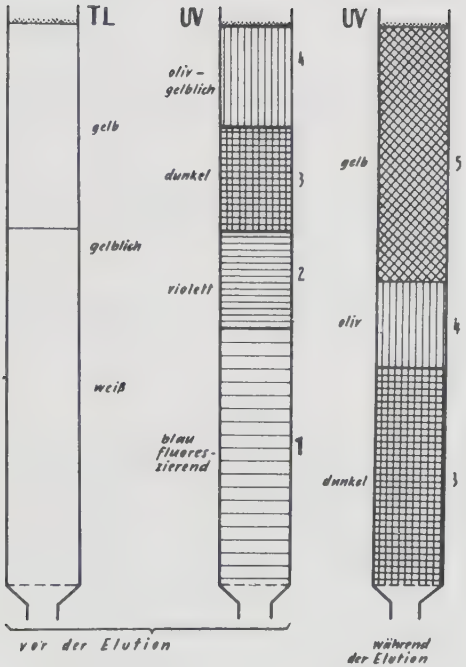


Abb. 7: Weitere chromatographische Auftrennung des Pflanzenextraktes aus Helichrysum arenarium an einer Polyamid-Säule (s.S. 54)

Weitere säulenchromatographische Auftrennung des Pflanzenextraktes:

Zunächst wurde die Zone, die bei der Vortrennung unterhalb der Chalkon-Zone lag (s.S. 52)(im Tageslicht gelblich, im UV-Licht bläulich-hell) mit Hilfe der oben beschriebenen säulenchromatographischen Methode aufgetrennt. Eine Säule von 5 cm lichter Weite wurde in einer Höhe von 40 cm mit Polyamidpulver beschickt und mit einer 3 cm hohen Schicht der genannten Aufschwemmung. Während des Eluierens ergab sich folgendes Bild: Siehe Abb.7. Bei längerem Eluieren bildeten sich noch weitere Zonen aus.

Die Eluate wurden eingeengt und zum Kristallisieren in den Eisschrank gestellt.

1a) Isolierung einer stark blau fluoreszierenden Substanz (A_8 = Scopoletin).

Das Eluat aus der blau fluoreszierenden Zone (Zone 1) zeigte sehr starke blaue Fluoreszenz. Die ausgefallenen Kristalle stellten aber nicht die fluoreszierende Substanz dar, wie die papierchromatographische Prüfung ergab, sondern bestanden zum größten Teil aus Helichrysin (das mengenmäßig die anderen Inhaltsstoffe von Helichrysum arenarium überwiegt). Die blau fluoreszierende Substanz war in Lösung geblieben. Da die Lösung noch nicht rein war, wurde ein Teil versuchsweise über eine kleine Säule von saurem Aluminiumoxyd geschickt und diese mit Methanol eluiert. Das Eluat fluoreszierte blau, vom Aluminiumoxyd wurde eine gelbe Zone zurückgehalten. Diese Filtration ermöglichte also eine teilweise Reinigung. Nach weiterem Probieren gelang mir diese später aber einfacher durch Ausschütteln der eingeengten Eluate mit Chloroform. Die blau fluoreszierende Substanz ging in das Chloroform über. Die Chloroformphase wurde

filtriert und das Chloroform abgedunstet. Zunächst wurde versucht, den Verdunstungsrückstand aus Aethanol-Aether umzukristallisieren. Als diese Methode nicht befriedigte, nahm ich den Verdunstungsrückstand mit heißem Essigester auf. Den hierin unlöslichen Rest filtrierte ich ab. Das Filtrat, die Essigesterlösung, stellte ich zur Kristallisation in den Eisschrank. Es fielen Kristalle aus.

1b) Identifizierung von A_8 als Scopoletin.

Der Niederschlag aus der Essigesterlösung (s.oben!) wurde papierchromatographisch folgenden Vergleichssubstanzen gegenübergestellt: Kaffeesäure, Ferulasäure, Chlorogensäure, 3,4-Methoxyzimtsäure, Aesculetin, Aesculin, Scopoletin, Herniarin. Er zeigte einen intensiv blau fluoreszierenden Fleck, der auf dem Papierchromatogramm dem Fleck von Scopoletin entsprach, daneben noch einen zweiten Fleck, der nur im kurzwelligen UV-Licht sichtbar wurde. Seine Farbe war dunkelblau und trat bei Gegenwart von Ammoniakdämpfen noch etwas deutlicher hervor.
Ich fertigte Papierchromatogramme an von meiner Substanz, im Wechsel aufgetragen mit Scopoletin, in folgenden Laufmitteln:

a) n-Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:5)
b) Eisessig-Wasser (1:9)
c) Eisessig-Wasser (15:85)

Die Chromatogramme wurden mit folgenden Reagenzien besprüht:

Eisenchloridlösung (1%ig) I
Methanolische Kalilauge (2n) II

		Scopoletin	blau fluoreszierende Substanz	
			Rf 1	Rf 2
Rf	a	0,85	0,85	
	b	0,56	0,56	0,67
	c	0,65	0,65	0,75
Farbe	TL	---	---	---
	UV	starke blaue Fluoreszenz	starke blaue Fluoreszenz	---
	kw.UV			dunkelblau
I	TL	ganz schwach grau	ganz schwach grau	---
	UV	kaum verändert	kaum verändert	---
	kw.UV			unverändert
II	TL	grünblau	grünblau	---
	UV	grünblaue Fluoreszenz	grünblaue Fluoreszenz	---
	kw.UV			etwas verstärkt

Tab. 5

Wie Tabelle 5 zeigt, entsprach der Fleck mit dem Rf-Wert 1 authentischem Scopoletin.
Die Lupenbetrachung der aus dem Essigester ausgefallenen Kristalle ergab, daß diese auch nicht einheitlich waren, sondern weiße Kristalle neben gelblichen zeigten.
Das Kristallgemisch war sublimierbar (ab 120°(-130°C)) und so wurde zur Orientierung ein qualitatives UV-Spektrum des Sublimates mit dem UV-Spektrum von sublimiertem Scopoletin (Sublimationsbeginn ab 137°C) verglichen. Die UV-Spektren waren nicht identisch.

Fraktionierte Sublimation:

In einem Sublimationsblock mit zwei seitlichen Bohrungen wurden zwei Reagenzgläser gesteckt. In das eine kam das Kristallgemisch, in das andere Scopoletin. Nun arbeitete ich bei einer 136°C nicht überschreitenden Temperatur, um das Sublimat Scopoletin-frei zu halten; das Reagenzglas mit Scopoletin diente dabei als Kontrolle, daß Scopoletin bei dieser Temperatur noch nicht sublimierte. Diese fraktionierte Sublimation nahm ziemlich viel Zeit in Anspruch.

UV-Absorptionsmessungen:

Das UV-Absorptionsspektrum des Sublimationsrückstandes ($=A_8$) deckte sich mit dem des Scopoletins:

A_8	: $\lambda_{Max.}$	230 ;	253 ;	297 ;	345	[mμ]
	: $\lambda_{Min.}$	217 ;	248 ;	271 ;	307	[mμ]
Scopoletin	: $\lambda_{Max.}$	229 ;	253 ;	298 ;	345	[mμ]
	: $\lambda_{Min.}$	218 ;	248 ;	271 ;	307	[mμ]

Die Identität der UV-Spektren zweier Stoffe genügt zwar nicht, die Identität der Stoffe selbst zu beweisen. Eine Aussage ist nur im Zusammenhang mit weiteren Kriterien möglich.

Schmelzpunkt:

Als ein solches Kriterium zog ich zog ich neben den papierchromatographischen Daten den Mischschmelzpunkt mit authentischem Scopoletin heran. Es trat keine Depression auf (204,5 - 205,5°C).

2) Isolierung einer weiteren sublimierbaren Substanz (=A_9) und deren Charakterisierung.

Das bei dem Experiment der fraktionierten Sublimation bei einer Temperatur unter 136°C gewonnene Sublimat (= A_9) verhielt sich papierchromatographisch wie der Fleck vom Rf_2 von Tabelle 5.
Dasselbe papierchromatographische Verhalten hatte auch eine "Substanz X" gezeigt, die im Rahmen von Voruntersuchungen nach mehrfacher Chromatographie an Polyamidsäulen in winzigen Mengen rein isoliert worden war und die folgendermaßen charakterisiert ist:

Weiße, im polarisierten Licht bunte Kristalle, bei 100°C geben sie anscheinend Wasser ab und werden im polarisierten Licht grau, ab 144°C geht der ganze große Kristall in ein Kristallkonglomerat von viel kleineren rautenförmigen Kristallen über, die im polarisierten Licht ganz bunt erscheinen und bei 179-181°C schmelzen.
Im Laufmittel Eisessig-Wasser (15:85) war Rf = 0,75. Der Fleck war im Tageslicht und im langwelligen UV-Licht unsichtbar, im kurzwelligen UV-Licht tiefblau. Durch Besprühen mit Eisenchloridlösung erfuhr er keine Veränderung, mit diazotiertem p-Nitranilin wurde er orangerot, mit Anilin-Glukose (Prüfung auf eine Säure) trat keine Reaktion ein.

Die Reinigung der Substanz durch Umsublimieren war bei 120-165°C erfolgt.

Das UV-Spektrum zeigte folgende Maxima und Minima (siehe Abb.4): $\lambda_{Max.}$ = 218 ; 255 ; 292 mμ

$\lambda_{Min.}$ = 234 ; 274 mμ

In alkalischer Lösung erfuhr das Spektrum eine Verschiebung zum Langwelligen hin.

Die Ergebnisse der UV-Absorptionsmessungen an A_9 zeigen die Abbildungen 4, 5 und 6.

Die Konzentration der Meßlösung betrug 10^{-2}g/Liter; bzw. je nach Spektralbereich mußten noch weitere Konzentrationen zur Messung herangezogen werden (5.10^{-3}; 2.10^{-2}; 3.10^{-2}; 10^{-1}).

Als Vergleichslösungen dienten:

Methanol p.a.

Natriumacetatlösung (wasserfrei, gesättigt in Methanol)

Natriumacetat (gesättigt)-Borsäure (1%ig) in Methanol

Natriummethylat (0,002molar) in Methanol

Aluminiumchlorid (0,5%ig) in Methanol.

3a) Isolierung von weißen Kristallnadeln (A_{10}=Apigenin-7-glukosid).

Der im UV-Licht dunkel erscheinende Teil der Mischzone (s.S. 52) wurde an Polyamidsäulen in der oben beschriebenen Weise weiter aufgetrennt: Säulen von 2,5 cm lichter Weite wurden in einer Höhe von 19 cm mit Polyamid beschickt, 1/2 cm hoch mit Seesand bedeckt, dann mit einer 3 cm hohen Schicht der Aufschwemmung der Mischzone in 50%igem Methanol und diese schließlich wieder mit Seesand. Während des Eluierens ergab sich folgendes Bild: Siehe Abb.8.

Beim Einengen des Eluates der achten Zone fiden ganz feine

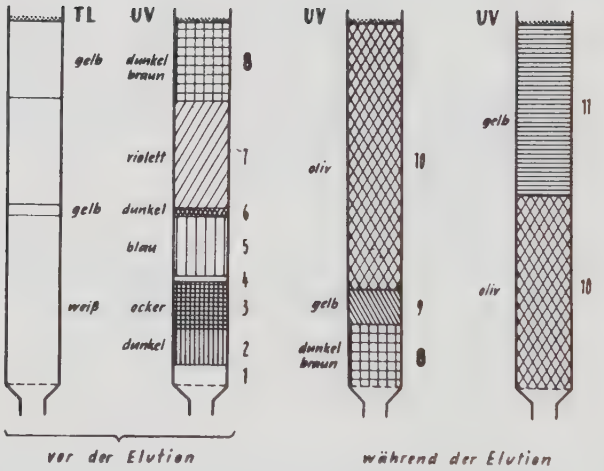


Abb. 8: Auftrennung der dunklen Mischzone (s.S.52) des Extraktes aus Helichrysum arenarium an einer Polyamidsäule (s.S.59).

weißliche Nädelchen aus.

3b) Identifizierung von A_{10} als Apigenin-7-glukosid.

Schmelzpunkt:
Der Schmelzpunkt der feinen weißlichen Nadeln lag bei 220°C.

Farbreaktionen:

a) Reduktionsprobe: Etwa 1 mg Substanz wurden in etwa 2 ml Methanol gelöst und in einem Reagenzglas mit 0,05 g Magnesium-Pulver unter Kühlung nach und nach mit 10 Tropfen konzentrierter Salzsäure versetzt. Nach jeder Salzsäurezugabe wurde das Glas verstöpselt. Die Lösung färbte sich orange.
Nach etwa einer Stunde, also nach vollständiger Reduktion der Substanz, wurde die Hälfte der Lösung α) nach und nach mit einer guten Messerspitze Natriumbikarbonat versetzt und immer wieder umgeschüttelt. Nach einiger Zeit färbte sich die Lösung violettrosa.
ß) Die andere Hälfte der reduzierten Lösung wurde nach Abpuffern mit Na-Acetat mit 1 Tropfen einer 1 %igen methanolischen Eisenchloridlösung versetzt: Es trat keine Farbänderung auf.

b) Eisenchloridreaktion:
Etwa 1 mg Substanz wurde in etwa 2 ml Methanol gelöst und mit 1 Tropfen einer 1 %igen methanolischen Eisen-III-chlorid-Lösung versetzt. Die Lösung färbte sich sofort olivgrün.

c) Anthron-Reaktion:
Etwa 1 mg Substanz wurde in etwa 2 ml Methanol gelöst. Etwa 1 mg Anthron wurde in einigen Tropfen Wasser und etwa 3 ml konzentrierter Schwefelsäure gelöst und diese Reagenzlösung mit der methanolischen Lösung der Substanz überschichtet. Nach einigen Minuten bildete sich an der Grenzschicht der beiden Lösungen ein grünblauer Ring aus.

UV-Absorptionsmessungen:

Die einzelnen Konzentrationen der Lösungen betrugen:

Apigenin-7-glukosid = 195 . 10^{-4} g/Liter

Apigenin-7-glukosid in
0,002 M Natriummethylat = 164 . 10^{-4} g/Liter

Die Natriummethylatlösung stellte ich mir selbst her. In absolutem Methanol (gewonnen durch Lösen von Natrium metallicum in Methanol und fraktionierte Destillation) löste ich reines metallisches Natrium und stellte den Faktor der Natriummethylatlösung ein durch Titration gegen n/100 HCl.

Hydrolyse:

a) Nachweis des Zuckers:

10 mg Substanz wurden in 10 ml n/2 HCl zehn Minuten am Rückflußkühler gekocht. Der Niederschlag (zum größten Teil ungelöstes Glykosid) wurde abfiltriert. Das Filtrat schüttelte ich mit Aether aus und neutralisierte es anschließend. In ausgedehnten Vorversuchen (Modellversuche) hatte sich folgende Arbeitsweise hierfür am geeignetsten gezeigt: In eine Bürette wurden 4 g des schwach basischen Ionenaustauschers II der Fa. MERCK gefüllt und mit destilliertem Wasser gewaschen; die neutrale Reaktion der abtropfenden Flüssigkeit kontrollierte ich mit pH-Papier MERCK. Diese Ionenaustauschersäule beschickte ich mit dem sauren Filtrat und wusch mit 30 ml destilliertem Wasser nach. Die so gewonnene neutrale Zuckerlösung engte ich im Vakuum bei 30°C ein.

In einem Parallelversuch wurde Apigenin-7-glukosid der gleichen Behandlung unterzogen.

Von den in der oben beschriebenen Weise neutralisierten Zuckerlösungen wurden Papierchromatogramme angefertigt, bei denen die Hydrolyseflüssigkeit von A_{10} und die von Apigenin-7-glukosid im Wechsel aufgetragen waren.

Als Laufmittel wurden folgende Lösungsmittelgemische verwendet:

a) n-Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:5)
b) Picolin-Ammoniak(10%)-Wasser (70: 2:28)
c) Aethylacetat-Pyridin-Wasser (2: 1: 2)
d) Phenol-Wasser (45: 5+40)
(45 g Phenol wurden in 5 ml Wasser gelöst, dann mit 40 ml Wasser geschüttelt; verwendet wurde die untere Phase)(1).

Nach dem Trocknen wurden die Chromatogramme sofort mit Anilin-Phthalsäure (36) besprüht, getrocknet und bei 105°C zehn Minuten lang im Trockenschrank erwärmt.

Auf den Chromatogrammen zeigten die braunen Zuckerflecken von der untersuchten Substanz und von Apigenin-7-glukosid den gleichen Rf-Wert, und zwar im Lösungsmittelgemisch

a) 0,21
b) 0,75
c) 0,22
d) 0,46

In b) und c) zeigten beide Lösungen einen weiteren ganz schwach braunen Fleck (bei b) Rf = 0,5 und bei c) Rf = 0,08).

b) Nachweis des Aglykons:

10 mg Substanz wurden in 1 ml Methanol und 1 ml HCl (15%) etwa 2 Stunden lang am Rückflußkühler gekocht. Das abfiltrierte Aglykon wurde mit Wasser säurefrei gewaschen, in wenig Methanol gelöst und neben Apigenin als Vergleichssubstanz papierchromatographisch geprüft.

Als Laufmittel fanden folgende Lösungsmittelgemische Anwendung:

a) Eisessig-Wasser (15:85)
b) Eisessig-Wasser (6: 4)
c) n-Butanol-Eisessig-Wasser (4: 1: 5)
d) m-Kresol-Eisessig-Wasser (50: 2:48)

Die Rf-Werte und die Farbe beider Substanzen stimmten gut überein. Siehe Tabelle 6:

		Aglykon von A_{10}	Apigenin
Rf	a	0,09	0,1
	b	0,65	0,65
	c	0,92	0,92
	d	0,92	0,92
Farbe	TL	fast farblos	fast farblos
	UV	dunkelrotbraun	dunkelrotbraun
methanol. KOH (3%)	TL	(grünlich-)gelblich	(grünlich-)gelblich
	UV	grünlich	grünlich
methanol. $ZrOCl_2$(2%)	TL	schwach gelblich-grün	schwach gelblich-grün
	UV	gelb (grüngelb)	gelb (grüngelb)
wäßr.Echtschwarz K (0,5%)	TL	blau	blau
	UV	dunkel-gelblich	dunkel-gelblich

Tab. 6

Das papierchromatographische Verhalten von A_{10} (Glykosid) wurde in folgenden Laufmitteln dem von Apigenin-7-glukosid gegenübergestellt:

a	Eisessig-Wasser	(15:85)
b	n-Butanol-Eisessig-Wasser	(4: 1: 5)
c	Phenol-Wasser	(73:27)
d	Aethylacetat-Ameisensäure-Wasser	(10: 2: 3)
e	Isopropanol-Ameisensäure-Wasser	(2: 5: 5)

Die Rf-Werte und die Farben beider Substanzen stimmten gut überein. Siehe Tabelle 7:

		A_{10}	Apigenin-7-glukosid
Rf	a	0,22	0,22
	b	0,67	0,67
	c	0,88	0,88
	d	0,68	0,68
	e	0,77	0,77
Farbe	TL	schwach hellgelb	schwach hellgelb
	UV	dunkel ocker	dunkel ocker
methanol. KOH (3%)	TL	grünlichgelb	grünlichgelb
	UV	leuchtend grünlich	leuchtend grünlich
methanol. $ZrOCl_2$ (2%)	TL	schwach grünlichgelb	schwach grünlichgelb
	UV	orangebraungelb	orangebraungelb
diazotiert. p-Nitranilin	TL	rotbraun	rotbraun
	UV	grüngelb	grüngelb
wäßr. Echtschwarz K (0,5%)	TL	--	--
	UV	--	--

Tab. 7

4) Isolierung von A_7 und seine Identifizierung als Kämpferol-3-glukosid.

Das letzte Eluat der Säule, aus der zu Beginn Scopoletin isoliert worden war, entsprach einer Zone, die im UV-Licht eine dunkle Farbe zeigte.

Zur Orientierung wurden mit ihm folgende Farbreaktionen ausgeführt:

a) Reduktionsprobe: Etwa 1 ml eingeengtes Eluat wurde in einem Porzellanschälchen mit etwas Magnesium-Pulver versetzt und dann tropfenweise mit konzentrierter Salzsäure. Es entstand eine lachsrosa Farbe.

b) TAUBÖCK-Reaktion: Etwa 2 ml eingeengtes Eluat wurden nach Zugabe von etwas Borsäure, Oxalsäure und Methanol zur Trockene eingedampft und der Rückstand mit Aether aufgenommen. Die Aetherlösung zeigte eine gelbgrüne Fluoreszenz.

Das eingeengte Eluat gab einen teils kristallinen Niederschlag. Nach Umkristallisieren aus heißem Wasser wurde er abgenutscht, in Aethanol gelöst, die aethanolische Lösung mit Kohle aufgekocht, filtriert und (1:1) mit Wasser verdünnt. Zunächst entstand keine Trübung. Nach vielen Wochen konnte ein kristalliner Niederschlag abgenutscht werden.

Der positive TAUBÖCK-Test zeigte ein Flavonol an. Da die Droge nach den Angaben der Literatur (45) Kämpferol-3-glukosid (nach (79) das entsprechende Diglukosid) enthalten sollte, wurde untersucht, ob die Kristalle diese Verbindung seien.

Das Ergebnis der papierchromatographischen Prüfung ist in der Tabelle 8 zusammengefaßt:

Als Laufmittel wurden folgende Lösungsmittelgemische verwendet:

a = n-Butanol-Eisessig-Wasser (4: 1: 5)
b = Eisessig-Wasser (30:70)
c = Aethylacetat-Ameisensäure-Wasser (10: 2: 3)

		A_7		Kämpferol-3-glukosid
		Rf_1	Rf_2	
Rf	a		0,66	0,65
	b	0,53	0,69	0,69
	c	0,60	0,74	0,74
Farbe	TL	--	fast farblos	fast farblos
	UV	dunkel	dunkel	dunkel
NH_3	TL	gelblich	grünlich-gelb	grünlich-gelb
	UV	gelblich-grün	oliv	oliv
$ZrOCl_2$	TL	--	zitronen-gelb	zitronengelb
	UV	grünlich	gelblich-grünlich	gelblich-grünlich
diazotiert. p-Nitranilin	TL	bräunlich	bräunlich	bräunlich
	UV	dunkel	dunkel	dunkel

Tab. 8

Die Substanz vom Rf_2 erwies sich papierchromatographisch als mit Kämpferol-3-monoglukosid identisch. (VRKOČ et al.(79) fanden ein Kämpferol-3-diglukosid, obwohl der von ihnen gemessene Schmelzpunkt ebenfalls für das Vorliegen eines Monoglukosids spricht!)

II. Helichrysum bracteatum (VENT.)WILLD.var.monstrosum Hort.luteum

Säulenchromatographische Auftrennung des wäßrigen Extraktes der gelben Sorte von Helichrysum bracteatum:

Eine Säule von 5 cm Ø wurde in einer Höhe von 22 cm mit dem Versuchsprodukt PP 15 Sp der BASF beschickt und die Kunstfaser mit 50%igem Methanol gewaschen, zum Schluß mit destilliertem Wasser. Eine Deckschicht von Seesand verhinderte das Aufwirbeln des Perlonpulvers. Die so vorbereitete Säule wurde mit 200 ml des wäßrigen Pflanzenextraktes beschickt. Nach Einsickern des Extraktes wurde die Säule mit 50%igem Methanol eluiert. Die einzelnen Fraktionen wurden in einem Fraktomatgerät gesammelt und papierchromatographisch der Trennvorgang verfolgt. Die Abbildung 9 zeigt die einzelnen Zonen, die sich an der Säule ausbildeten. Die Chromatogramme zeigen, daß an der Säule noch keine vollständige Trennung erreicht wurde, das Stoffgemisch aber doch schon eine weitgehende Aufgliederung erfahren hat. Die Eluate, die sich papierchromatographisch als identisch erwiesen, wurden vereinigt und im Vakuum eingeengt. Gelbe Kristallnadeln ($=B_7$) fielen aus dem Eluat aus, das Zone 7 der Säule entsprach; B_9 kristallisierte in Form kleiner gelber Kristallrosetten, die sich später orangerot verfärbten.

1) Identifizierung der gelben Kristallnadeln ($= B_7$) als Luteolin-7-glukosid.

Schmelzpunkt:

Der Schmelzpunkt der sehr feinen Kristallnadeln lag bei 248-252°C.

Farbreaktionen:

a) Reduktionsprobe: Etwa 1 mg Substanz wurden in etwa 2 ml Methanol gelöst und in einem Reagenzglas mit 0,05 g Magnesium-Pulver unter Kühlung nach und nach mit 10 Tropfen konzentrierter Salzsäure versetzt. Nach jeder Salzsäurezugabe wurde das Glas verstöpselt. Die Lösung färbte sich lachsrot.

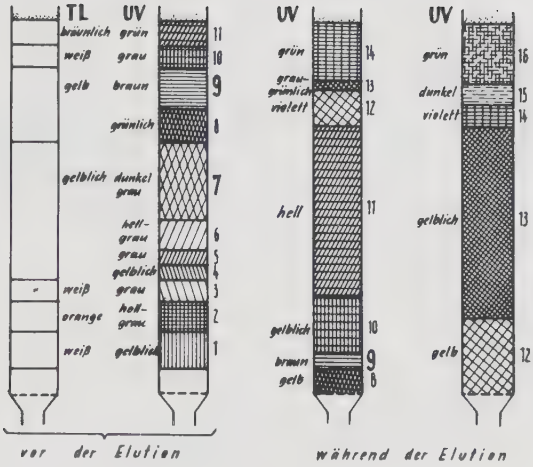


Abb. 9: Auftrennung des Extraktes aus Helichrysum bracteatum an einer Polyamid-Säule

Nach etwa einer Stunde, also nach vollständiger Reduktion der Substanz, wurde eine Hälfte der Lösung nach und nach mit einer guten Messerspitze Natriumbikarbonat versetzt und immer wieder umgeschüttelt. Nach einiger Zeit färbte sich die Lösung (violett)-blau.

b) Eisenchloridreaktion: Die andere Hälfte der Lösung wurde mit gesättigter Natriumacetatlösung abgepuffert und dann mit 1 Tropfen 1 %iger methanolischer Eisenchloridlösung versetzt: es entstand eine schwach blau-violette Färbung.

c) Anthron-Reaktion: Etwa 1 mg Substanz wurde in etwa 2 ml Methanol gelöst. Etwa 1 mg Anthron wurde in einigen Tropfen Wasser und etwa 3 ml konzentrierter Schwefelsäure gelöst und diese Reagenzlösung mit der methanolischen Lösung der Substanz überschichtet. Nach einigen Minuten bildete sich an der Grenzschicht der beiden Lösungen ein grünblauer Ring aus.

UV-Absorptionsmessungen

Die Konzentration der Meßlösungen betrug $2 \cdot 10^{-2}$ g/Liter. Als Vergleichslösungen dienten

Methanol p.a.

Natriumacetatlösung (wasserfrei, gesättigt in Methanol)

Natriumacetat (0,5 %ig)-Borsäure (1%ig) in Methanol

Natriummethylat (0,002molar) in Methanol

Aluminiumchlorid (0,5%ig) in Methanol.

Die Konzentration der Substanz in reinem Methanol, bzw. den anderen Lösungen, betrug immer $2 \cdot 10^{-2}$ g/Liter. Die Meßergebnisse zeigen die Abbildungen 10 - 13.

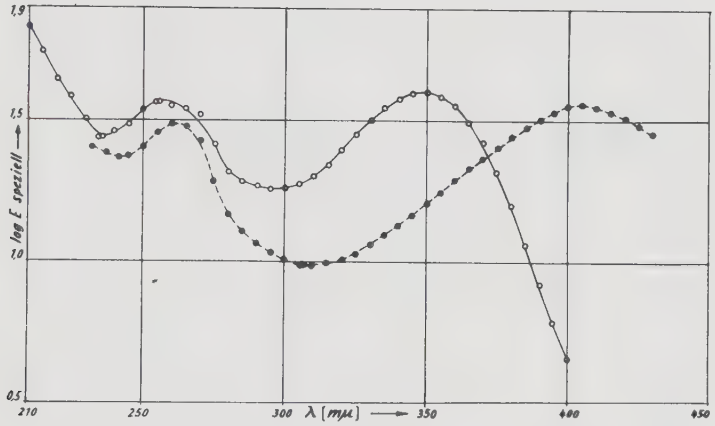


Abb.10: UV-Absorptionskurven von B_7=Luteolin-7-glukosid isoliert aus Helichrysum bracteatum

o = methanolische Lösung

. = +Natriumacetat (wasserfrei gesättigt in Methanol)

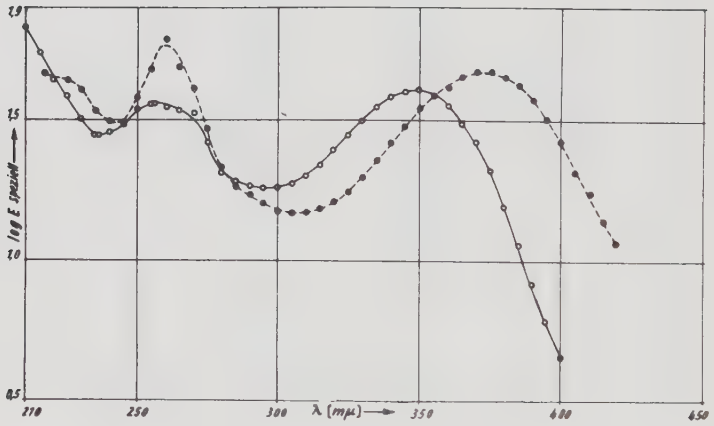


Abb. 11: UV-Absorptionskurven von B_7=Luteolin-7-glukosid isoliert aus Helichrysum bracteatum

o = methanolische Lösung

• = +Natriumacetat (0,5%ig) + Borsäure (1%ig) in Methanol

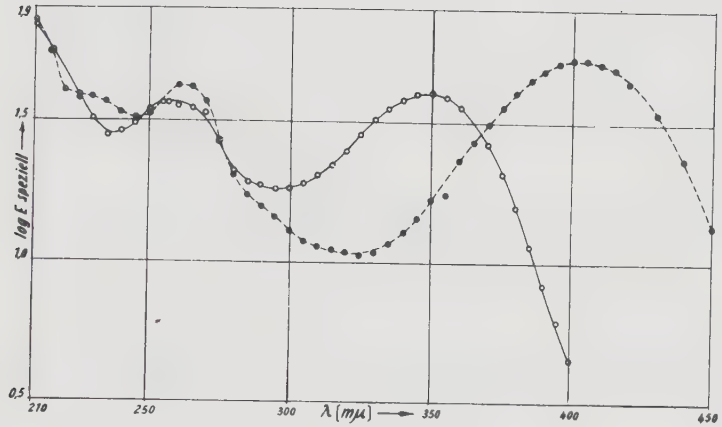


Abb. 12: UV-Absorptionskurven von B_7=Luteolin-7-glukosid isoliert aus Helichrysum bracteatum
o = methanolische Lösung
. = +Natriummethylat (0,002 molar in Methanol)

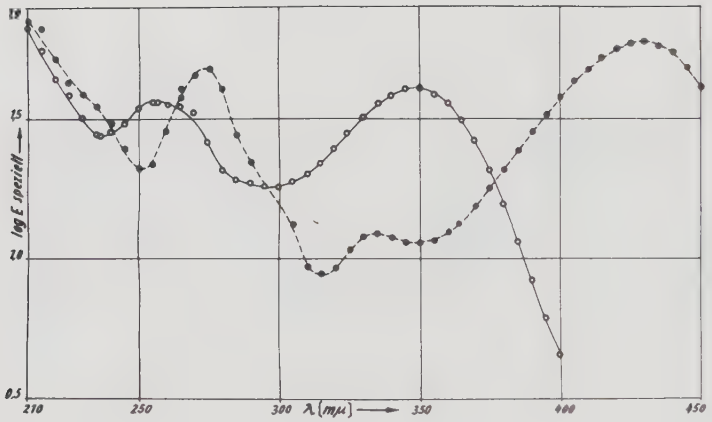


Abb. 13: UV-Absorptionskurven von B_7=Luteolin-7-glukosid
isoliert aus Helichrysum bracteatum
o = methanolische Lösung
. = +Aluminiumchlorid (0,5%ig in Methanol)

Alkalischmelze

KOH in rotulis (etwa 6 rotulis) wurden in einem Reagenzglas mit Hilfe eines Paraffinbades geschmolzen. Als die Schmelze eine Temperatur von 195°C erreicht hatte, wurden ihr etwa 5 mg der zu untersuchenden Substanz zugefügt. Die nun gelbe Mischung wurde 3 Minuten auf 205°C erhitzt. Nach dem Erkalten wurde die erstarrte Schmelze in 2 ml Wasser gelöst und mit 10%iger Salzsäure angesäuert. Dabei hellte sich die Farbe der Lösung auf. Die saure Lösung wurde mit Aether ausgeschüttelt, die Aetherphase mit Natrium sulfuricum siccum getrocknet, der Aether abgedampft und der Rückstand in Methanol gelöst. Diese Lösung wurde papierchromatographisch geprüft. Als Laufmittel fanden folgende Lösungsmittelgemische Anwendung:

a) Eisessig - Wasser (2:98)

b) m-Kresol-Eisessig-Wasser (50: 2:48)

Das Ergebnis der chromatographischen Prüfung zeigt Tabelle 9:

		Produkte der Alkali-Spaltung		Protocatechusäure	Phloroglucin
Rf	a	0,45	0,56	0,48	0,56
	b	0,30	0,14	0,29	0,14
Farbe	TL	--	--	--	--
	kw.UV.	blaßblau	violett	blaßblau	violett
NH_3	TL	--	--	--	--
	kw.UV.	blaßblau	hellblau fluoresz.	blaßblau	hellblau fluoresz.
diazotiert. p-Nitranilin	TL	violett	orange	violett	orange

Tab. 9

Anschließend wurde B_7 papierchromatographisch mit authentischem Luteolin-7-glukosid verglichen. Als Laufmittel wurden folgende Lösungsmittelgemische verwendet:

a	n-Butanol-Eisessig-Wasser	(4: 1: 5)
b	Isopropanol-Ameisensäure-Wasser	(2: 5: 5)
c	Eisessig-Wasser	(50:50)
d	Eisessig-Wasser	(30:70)

Das Ergebnis der Untersuchung zeigt Tabelle 10.

		B_7	Luteolin-7-glukosid
Rf	a	0,46	0,46
	b	0,58	0,59
	c	0,57	0,57
	d	0,28	0,28
Farbe	TL	fast farblos	fast farblos
	UV	dunkel(ocker)	dunkel(ocker)
NH_3	TL	gelblich	gelblich
	UV	grünlich-gelb	grünlich-gelb
Echtschwarz K(0,5%ig, wäßrig)	TL	ockergelb-bräunlich	ockergelb-bräunlich
	UV	gelb	gelb

Täb. 10

Der Mischschmelzpunkt mit Luteolin-7-glukosid zeigte keine Depression: 249-254 (Zers.)

2) Identifizierung der kleinen Kristallrosetten (= B_9)

als Auronderivat.

Schmelzpunkt:

Ab 100 - 120° wurden die Kristalle im polarisierten Licht unsichtbar. Ab 245° bildeten sich an den Rändern der ursprünglichen Kristalle neue kleine, im polarisierten Licht sichtbare, Kristallnädelchen, die dann bei etwa 350° schmolzen (Zersetzung).

Farbreaktionen:

a) Reduktionsprobe: Es trat keine Färbung auf, wenn die methanolische Lösung der Substanz mit etwas Magnesium-Pulver und einigen Tropfen konzentrierter Salzsäure versetzt wurde.

b) Eisenchloridreaktion: 2%ige wäßrige Eisenchloridlösung färbte die methanolische Lösung der Substanz grün.

c) Einwirkung von Alkalien in der Kälte: 10%ige Kalilauge färbte die Substanz schmutzig-rostbraun. Das Papierchromatogramm der Substanz färbte sich unter dem Einfluß von Ammoniakdämpfen orangerot.

d) Einwirkung von konzentrierter Schwefelsäure: Konzentrierte Schwefelsäure färbte die Substanz intensiv orangetomatenrot.

Papierchromatographie:

Als Laufmittel wurden folgende Lösungsmittelgemische verwendet: a = n-Butanol-Eisessig-Wasser (4: 1: 5)
b = Eisessig-Wasser (30:70)
c = 50% Isopropanol
d = n-Butanol-2nNH_3 (1: 1)

Die Rf-Werte in den verschiedenen Laufmitteln und die Farben der Flecken, auch nach Behandeln mit Reagenzien, zeigt Tabelle 11.

		B_9	
		Rf_1	Rf_2 (schwächer)
Rf	a	0,31	0,45
	b	0,14	0,23
	c	0,49	0,67
	d	0,00	0,00
Farbe	TL	gelb	schwach gelblich
	UV	zitronengelb	schwach gelblich
NH_3	TL	orange-rot	schwach orange-gelb
	UV	orange-rot	schwach orange
$AlCl_3$	TL	gelb	schwach gelblich
	UV	(orange)-gelb	grünlich fluoreszierend

Tab. 11

UV-Absorptionsmessungen

Als Vergleichslösungen dienten:

Methanol p.a.

Natriumacetatlösung (wasserfrei, gesättigt in Methanol)

Natriumacetat (gesättigt) - Borsäure (1%ig) in Methanol

Natriummethylat (0,002 molar) in Methanol
Aluminiumchlorid (0,5%ig) in Methanol.

Die Konzentration der Substanz in reinem Methanol, bzw. den anderen Lösungen, betrug 2.10^{-2}/Ltr.(Siehe Tabelle 4)

GIBBS - Test:

1 mg Substanz wurden in einem 25 ml Meßzylinder in 1 ml Pyridin gelöst und mit 5 ml frisch bereiteter GIBBS-Reagenzlösung (25 mg 2,6-Dichlorchinonchlorimid wurden in 15 ml Pyridin gelöst) versetzt. Die Mischung wurde mit Natriumboratpuffer vom P_H = 9,2 auf 20 ml aufgefüllt. Nach dem Mischen wurde nach 15 Min. das UV-Absorptionsspektrum der Lösung gemessen.

Als Vergleichslösung diente eine Mischung von Pyridin, GIBBS-Reagenzlösung und Boratpuffer im gleichen Mengenverhältnis. Ergebnis: $\lambda_{Max.}$ = 685 mμ.

Alkalispaltung:

Wurde die Aufspaltung des B_9-Moleküls mit Hilfe einer Schmelze von KOH in rotulis versucht, so erschien auf den Papierchromatogrammen immer wieder die unveränderte Ausgangssubstanz statt irgendwelcher Spaltprodukte. Das änderte sich auch nicht durch Variieren von Erhitzungszeit und Erhitzungstemperatur.

Die Aufspaltung gelang bei folgender Versuchsanordnung: Etwa 2 mg Substanz wurden in einem kleinen Schliffgefäß mit aufgesetztem Kühler mit 2 ml 50%iger Kaliumhydroxyd-Lösung im Sandbad 30 Minuten zum Sieden erhitzt. Die abgekühlte Lösung wurde mit 2n-Schwefelsäure angesäuert und mehrmals mit je 5 ml Aether ausgeschüttelt. Der Aether wurde mit destilliertem Wasser neutral gewaschen, mit Natrium sulfuricum siccum getrocknet und im Vakuum abdestilliert.

Der Rückstand der Aetherphase wurde in wenig Methanol aufgenommen und papierchromatographisch in folgenden Laufmitteln

geprüft:

a) 2%ige Essigsäure

b) m-Kresol-Eisessig-Wasser (50: 2:48).

		Spaltprodukte Rf_1	Spaltprodukte Rf_2	Phloroglucin
Rf	a	0,42(0,43)	0,57	0,57
	b	0,69	0,16	0,16
Farbe	TL	--	--	--
	UV	--	--	--
	kw.UV	(mittel-) blau	violett	violett
+ NH_3	TL			
	UV	hellblaugrün	hellblau fluoresz.	hellblau fluoresz.
	kw.UV	hell(blau)-grünlich	hellblau fluoresz.	hellblau fluoresz.
diazotiertes p-Nitranilin	TL	gelbbraun	organgebraun	organgebraun
Echtschwarz K (0,5%ig wäßrig)	TL	violett	blau	blau
Ammoniak, Silbernitratlösg.	TL	schwach positiv (bräunlich)		
$FeCl_3$	TL	violett -> grau		

Tab. 12

Wurde nur 10 Minuten lang gekocht, resultierten zwar die gleichen Flecken auf den Papierchromatogrammen, darüber-hinaus aber noch ein kräftiger Fleck von B_9.

Hydrolyse:

Unter den Bedingungen einer einfachen Säurehydrolyse blieb die Substanz unverändert. Eine hydrolytische Spaltung gelang unter folgenden experimentellen Bedingungen:
5 mg Substanz wurden nach Zusatz von 1 ml Methanol und 1 ml Salzsäure (15%ig) 6 Stunden lang auf dem Luftbade gekocht. Hierbei vertiefte sich die orangegelbe Farbe der Lösung nach einigen Stunden zu braunorange. Nach Abdunsten des Methanols wurde die wäßrige Phase mehrmals mit Aether ausgeschüttelt. In der wäßrigen Phase wurde papierchromatographisch Glukose nachgewiesen. Die Aetherphase wurde mit destilliertem Wasser neutral gewaschen, mit Natrium sulfuricum siccum getrocknet, der Aether abgedunstet, der Verdunstungsrückstand mit wenig Methanol aufgenommen und, im Wechsel mit der Ausgangssubstanz, in folgenden Laufmitteln chromatographiert:

a = n-Butanol-Eisessig-Wasser (4: 1: 5)
b = Eisessig-Wasser (30:70)
c = Isopropanol-Wasser (50:50)

Die Rf-Werte in den verschiedenen Laufmitteln und die Farben der Flecken zeigt Tabelle 13:

		B_9	Aglykon von B_9
Rf	a	0,32	0,42
	b	0,18	0,08
	c	0,49	0,47
Farbe	TL	gelb	gelb
	UV	zitronengelb	zitronengelb
NH_3	TL	orangerot	orangerot
	UV	orangerot	orangerot

Tab. 13

Eine qualitative Bestimmung der UV-Absorptionskurven des Aglykons ergab die in Tabelle 14 aufgeführten Meßwerte:

	I. Bande		II. Bande	
	$\lambda_{Max.}$ [mμ]	$\Delta\lambda$ [mμ]	$\lambda_{Max.}$ [mμ]	$\Delta\lambda$ [mμ]
Methanol	403	---	260	---
+Na-acetat	instabil 340 449	 + 46	 285	 + 25
+Na-acetat +Borsäure	336 427	 + 24	 265	 + 5
+$AlCl_3$	344 500	 + 97	 295	 + 35
+Na-Methylat	instabil (350) 455	 + 52	 275	 + 15

Tab. 14

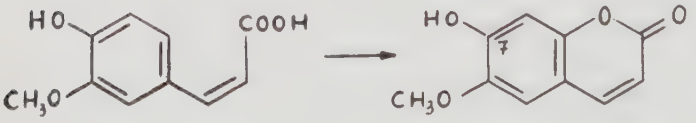
D. D I S K U S S I O N

Nach den bisher vorliegenden Arbeiten zahlreicher Autoren über die Biosynthese von Naturprodukten, denen ein C_6-C_3=Körper, bzw. das C_6-C_3-C_6=Gerüst, zugrunde liegt, wurden folgende Vorstellungen erarbeitet:

Es bestehen enge Beziehungen zwischen der Biosynthese von Zimtsäuren, Cumarinen und Flavonoiden.

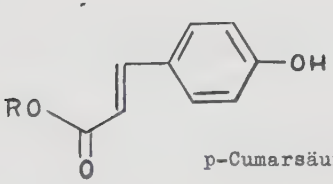
Während der aromatische Ring A in den Flavonoiden aus Acetat-Einheiten aufgebaut wird (BIRCH), stammt Ring B und die anschließende C_3-Gruppe von C_9-Zwischenprodukten, die aus Kohlenhydraten auf dem Wege über 5-Dehydrochinasäure, 5-Dehydroshikimisäure, Shikimisäure und Prephensäure gebildet wurden (DAVIS). Die C_3-Einheit, die beim Übergang von Shikimisäure in Prephensäure angelagert wird, entsteht durch einfache Glykolyse der Hexosen. (Die Verwandtschaft der Biosynthese von Zimtsäuren, Cumarinen und Flavonoiden betrifft den C_9-Körper, nicht den Ring A der Flavonoide).

Zu diesen schon recht weitreichenden Erkenntnissen führten biochemische und genetische Forschungen, sowie Experimente unter Zuhilfenahme der Tracer-Methode. So ergab beispielsweise die Verfütterung von markiertem Phenylalanin an Nicotiana tabacum sowohl markierte Kaffeesäure in dieser Pflanze als auch markiertes Scopoletin. Bisherige Untersuchungen haben gezeigt (32), daß die Biosynthese vieler Cumarine mit ziemlicher Sicherheit auf dem Wege über Shikimisäure→Prephensäure erfolgt.
Helianthus annuus u.a. Pflanzen waren imstande (66), bei Angebot von markierter Ferulasäure markiertes Scopolin (=Scopoletin-D-glukosid) zu bilden.

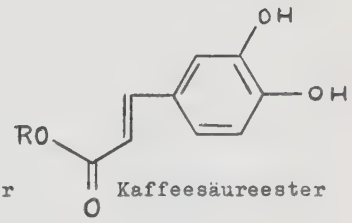


Ferulasäure Scopoletin

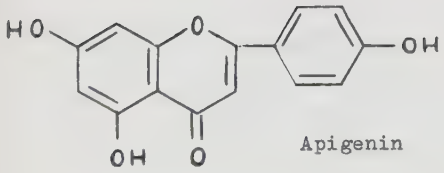
Derartige Experimente stützen die von anderen Autoren schon früher geäußerte Vermutung, daß Cumarine aus Zimtsäuren entstehen durch oxydativen Ringschluß. Auch konnte man beweisen, daß bei der Flavonoid-Biosynthese Zimtsäuren direkt mit Acetat kondensiert werden (möglicherweise unter Bildung von Chalkon-artigen Zwischenprodukten). Demnach stellen Zimtsäurederivate sowohl Vorläufer der Flavonoide als auch der Cumarine dar.
Für die Bedeutung von Zimtsäuren für die Biosynthese von Flavonoiden spricht auch die Beobachtung von GEISSMAN und HARBORNE, daß Albino-Blüten von Antirrhinum majus Ester der p-Cumarsäure und der Kaffeesäure enthalten (Flavonoide fehlen der Albinoform), während die normalen Blüten dieser Pflanze Apigenin und Luteolin enthalten.



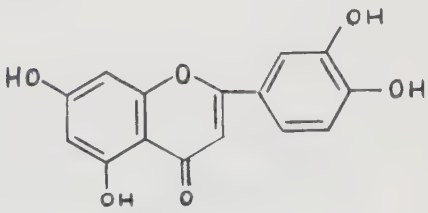
p-Cumarsäureester



Kaffeesäureester



Apigenin



Luteolin

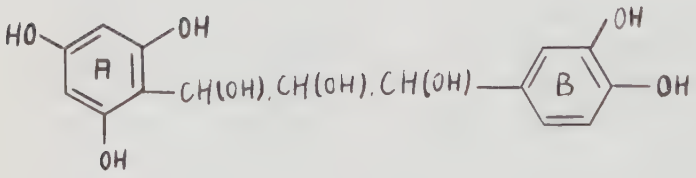
Wie die Formelbilder zeigen, ist Zahl und Anheftungsstelle der Hydroxylgruppen die gleiche bei den genannten Säuren wie bei

den Flavonoiden. Das würde die Vermutung nahelegen, daß Art und Stellung der Substituenten in Ring B der Flavonoide bereits festgelegt ist, bevor es zu einer Kondensation des Phenylpropan-Gerüstes mit den Acetateinheiten, d.h. mit dem Ring A, kommt.

Gerade diese Frage ist aber bis heute noch nicht geklärt, nämlich die Frage: Findet die Hydroxylierung des C_6(B)-Ringes vor oder nach der Ausbildung des C_6-C_3-C_6=Grundkörpers statt ?

Die einzelnen Flavonoid-Typen unterscheiden sich voneinander einmal dadurch, daß entweder die C_3-Gruppe als Kohlenstoffkette die beiden aromatischen Ringe verbindet (Chalkone) oder sie Teil eines heterocyklischen 5-Ringes (Aurone) oder 6-Ringes wird. Je nach Oxydationsgrad des heterocyklischen 6-Ringes haben wir Flavone, Flavonole, Flavanone, Flavanonole, Anthocyane etc. vor uns. Die Frage ist, ob der C_3-Körper vor oder nach Zusammenschluß eines Phenylpropankörpers mit den Acetateinheiten des Ringes A modifiziert wird. Für die letztere Alternative spricht die Beobachtung, daß durch Oxydation oder Reduktion ein Flavonoid-Typ in einen anderen überführt werden kann. So konnte unter anderem gezeigt werden (8), daß die Umwandlung von Hydroxychalkonen zu Hydroxyauronen durch ein Enzym katalysiert wird.

Während ROBINSON alle Flavonoide auf eine hypothetische gemeinsame Vorstufe folgender Struktur



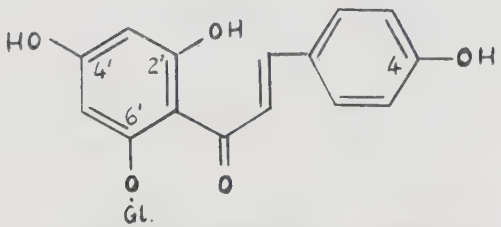
zurückführt, glaubt DAYTON (10) aus seinen genetischen Experimenten die Schlußfolgerung ziehen zu können, daß es mehrere, verhältnismäßig einfach gebaute Vorstufen gibt, die in Abhängigkeit von der genetisch fixierten Anlage gebildet und in verschiedener Weise miteinander verknüpft werden können.
Das Studium der einschlägigen Literatur zeigt demnach - faßt man zusammen - folgende z.Zt. noch offenstehende Fragen:

1) Wann findet die Endausgestaltung der C_3-Gruppe der Flavonoide statt (vor oder nach Aufbau des C_6-C_3-C_6=Skeletts)?
2) Wann erfährt der Ring B seine Endausgestaltung (Hydroxylierung, Substitution)?
3) Wann findet die Anheftung des Zuckerrestes bei Glykosiden statt?

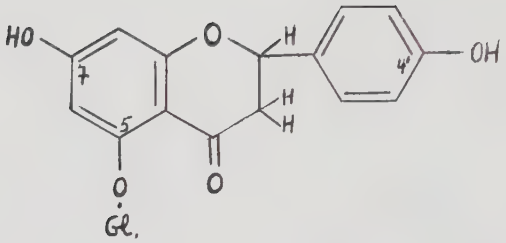
Stellt man nun zur Diskussion, inwieweit die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit u.U. einen Baustein abgeben können auf dem Wege zur Beantwortung dieser Fragen, so stehen folgende Gedankengänge zur Verfügung:

Wie die Arbeiten von GEISSMAN und seiner Schule gezeigt haben, kann es im Rahmen von biogenetischen Untersuchungen wichtig sein, alle in einer Pflanze vorkommenden Pigmente und der diesen verwandten Verbindungen eingehend zu studieren, um etwas genaueren Einblick in verwandtschaftliche Zusammenhänge dieser Stoffe zu erhalten.

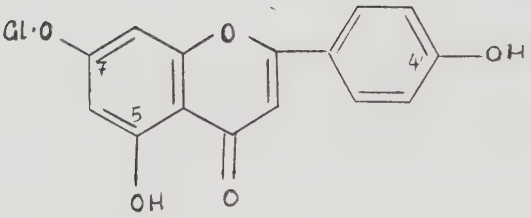
Das Nebeneinander-Auftreten von



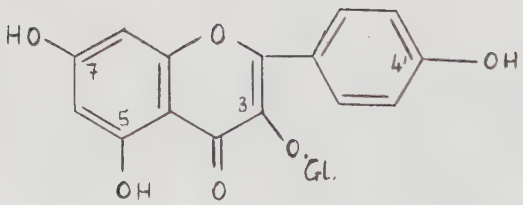
Isosalipurposid=2',4,4',6'tetrahydroxychalkon-6'-glukosid



Helichrysin = Naringenin-5-glukosid



Apigenin-7-glukosid

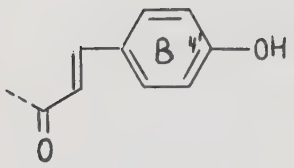


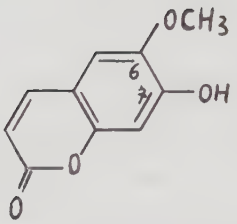
Kämpferol-3-glukosid

läßt die Vermutung nicht unberechtigt erscheinen, daß bei Frage 1) die zweite Alternative mehr an Wahrscheinlichkeit besitzt, d.h., daß oxydative und reduktive Veränderungen an der C_3-Gruppe des Moleküls nach Aufbau des gesamten C_6-C_3-C_6= Grundgerüstes stattfinden.
Während GEISSMAN et al. (24) aus dem Bau der Blütenpigmente von Coreopsis maritima den Schluß zogen, daß der biosynthetische Weg, der zu den Flavonen führt, früh von dem abzweigt, auf dem Chalkone und Aurone entstehen (Unterschiede in der Hydroxylierung des Ringes A), weisen die in Flores Stoechados gefundenen Flavonkörper denselben Bau von Ring A auf wie das gleichzeitig in der Pflanze enthaltene Chalkon (Isosalipurposid).

Die Tatsache, daß sämtliche in der Pflanze (Helichrysum arenarium) gefundenen Flavonoide eine Hydroxylgruppe in 4'-Stellung tragen, der Ring B also gleichförmig gestaltet ist, läßt die Vermutung zu, daß seine Ausgestaltung bereits vor der Kondensation des C_6-C_3-Körpers mit den Acetat-Einheiten, die zu Ring A führten, abgeschlossen war, allen vorliegenden Flavonoid-Typen also dieselbe Phenyl-Propan=Vorstufe als Baustein diente.
Was die Beantwortung der dritten Frage anlangt, so führt das gleichzeitige Auftreten von C_5-, C_7- und C_3-glukosiden zu der Schlußfolgerung, daß die Glykosidbildung einen der letzten Schritte auf dem Biosynthesewege und daher eine späte Differenzierung darstellt.

Während sämtliche in der Pflanze angetroffenen Flavonoide im Ring B des Moleküls nur eine Hydroxylgruppe tragen (in 4'-Stellung), weist das in derselben Pflanze gefundene Cumarin neben der entsprechenden Hydroxylgruppe (in 7-Stellung) noch eine Methoxylgruppe in 6-Stellung auf.





Scopoletin

Gehen wir nun von der eingangs diskutierten Vorstellung aus, daß sowohl Cumarine als auch Flavonoide auf gemeinsame C_6-C_3-Vorstufen zurückzuführen sind, daß Zimtsäurederivate sowohl Vorläufer der Flavonoide (Ring B) als auch der Cumarine sein können, so legen die Versuchsergebnisse dieser Arbeit die Vermutung nahe: Der Biosyntheseweg, der zum Scopoletin führt, zweigt entweder schon früh von dem Biosyntheseweg ab, auf dem alle in der genannten Pflanze gefundenen Flavonoide entstehen, oder aber man müßte eine sehr späte Einführung einer Methoxylgruppe in eine 7-Hydroxy-Cumarin=Vorstufe annehmen.

Die Auffindung von Luteolin-7-glukosid neben dem noch nicht näher definierten Anthochlor-Pigment zeigt zunächst, daß beide Substanzen im Bau von Ring A übereinstimmen. Einem solchen Bau von Ring A begegnen wir auch bei Helichrysum arenarium; der Typ scheint also in der Gattung weiter verbreitet zu sein.

Zusammenfassung

Eine eingehende Untersuchung von Helichrysum-Arten sollte Inhaltsstoffe finden helfen, die möglicherweise in biogenetischem Zusammenhang stehen könnten mit den bereits früher aus Helichrysum arenarium isolierten Flavonoiden.

Es gelang aus Helichrysum arenarium die folgenden Stoffe zu isolieren und zu identifizieren: Scopoletin (6-Methoxy-7-Hydroxy-Cumarin) und Apigenin-7-glukosid (5,7,4'-Trihydroxyflavon-7-glukosid). Nachgewiesen und isoliert wurde ferner eine Substanz (Weiße Kristalle, Schmp. = 179-181°C, $\lambda_{Max.}$ = 218, 255, 292 mμ), deren Konstitution noch unbekannt ist.

Aus einer gelben Sorte von Helichrysum bracteatum wurden isoliert: Luteolin-7-glukosid (5,7,3',4'-Tetrahydroxyflavon-7-glukosid) und ein Anthochlorpigment. Bei dem Anthochlorpigment handelt es sich um ein bisher in der Literatur noch nicht beschriebenes glykosidisches Auronderivat (Gelbe Kristalle, Schmp. 245°C (Zersetzung), $\lambda_{Max.}$ = 259, 409 mμ).

Der Molekülbau der in den beiden verschiedenen Helichrysum-Arten vorkommenden Phenylpropankörper wird verglichen und mögliche biogenetische Zusammenhänge diskutiert.

L i t e r a t u r

1. S.ARONOFF, J.org.Chemistry 5, 561 (1940)
2. E.C.BATE-SMITH and R.G.WESTALL, Biochimica et Biophysica Acta 4, 427 (1950)
3. E.C.BATE-SMITH and T.SWAIN, J.Chem.Soc.(London) 2185 (1953 II)
4. F.BERGER, Handbuch der Drogenkunde, Wien 1949
5. A.J.BIRCH, P.ELLIOTT, and A.R.PENFOLD, Austral.J.Chem.7, 169 (1954)
6. A.J.BIRCH, R.A.MASSY-WESTROPP, and C.J.MOYE, Austral.J.Chem.8,539 (1955)
7. A.J.BIRCH in L.ZECHMEISTER, Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe XIV,p.186, Wien 1957
8. L.BOGORAD, Annual Review of Plant Physiology 9, 417 (1958)
9. A.L.CABRERA, Manual de la flora de los alrededores de Buenos Aires, Buenos Aires 1953
10. T.O.DAYTON, J.Genet. 54, 249 (1956)
11. R.DREYWOOD, Industr.Engineer.Chem., Analyt.edit.18, 499(1946)
12. Erg.-B.6, Stuttgart 1953
13. L.FARKAS, L.PALLIOS und Z.PAAL, Chem.Ber.92, 2847 (1959)
14. H.FRIEDRICH, Pharmazie 13, 349 (1958)
15. T.A.GEISSMAN, J.Amer.Chem.Soc.63, 656 (1941)
16. T.A.GEISSMAN, J.Amer.Chem.Soc.64, 1704 (1942)
17. T.A.GEISSMAN and Ch.D.HEATON, J.Amer.Chem.Soc.65, 677 (1943)
18. T.A.GEISSMAN and Ch.D.HEATON, J.Amer.Chem.Soc.66, 486 (1944)
19. T.A.GEISSMAN and L.JURD, J.Amer.Chem.Soc.76, 4475 (1954)
20. T.A.GEISSMAN and J.B.HARBORNE, J.Amer.Chem.Soc.77, 4622 (1955)
21. T.A.GEISSMAN and J.B.HARBORNE, Arch.Biochem.and Biophys.55, 447 (1955)
22. T.A.GEISSMAN in PAECH-TRACEY, Moderne Methoden der Pflanzenanalyse, III, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1955
23. T.A.GEISSMAN und U.KRANEN-FIEDLER, Naturwissenschaften 43, 226 (1956)

24. T.A.GEISSMAN, J.B.HARBORNE, and M.K.SEIKEL, J.Amer.Chem.Soc. 78, 825 (1956)

25. T.A.GEISSMAN and J.B.HARBORNE, J.Amer.Chem.Soc.78, 829 (1956)

26. T.A.GEISSMAN and J.B.HARBORNE, J.Amer.Chem.Soc.78, 832 (1956)

27. T.A.GEISSMAN and T.SWAIN, Chem.and Ind. 984 (1957)

28. O.GEßNER, Die Gift- und Arzneipflanzen von Mitteleuropa, Heidelberg 1953

29. J.A.GOODSON, Biochem.J. 16, 489 (1922)

30. W.GRASSMANN, H.HÖRMANN und A.HARTL, Makromolekulare Chem.XXI, 37 (1956)

31. W.GRASSMANN, H.ENDRES, M.OPPELT and Hassan EL SISSI, Das Leder X, 149 (1959)

32. H.GRISEBACH and W.D.OLLIS, Experientia 11, 4 (1961)

33. R.HÄNSEL in H.F.LINSKENS, Papierchromatographie in der Botanik, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1959

34. R.HÄNSEL und D.HEISE, Arch.Pharmaz.292, 398 (1959)

35. R.HÄNSEL, G.PINKEWITZ, L.LANGHAMMER und D.HEISE, Arch.Pharmaz.293, 485 (1960)

36. I.M.HAIS und K.MACEK, Handbuch der Papierchromatographie, Jena 1958

37. G.HEGI, Illustrierte Flora von Mittel-Europa, VI, München 1906

38. D.HEISE, Diss.Berlin (1959)

39. L.HÖRHAMMER und R.HÄNSEL, Arch.Pharmaz. 287, 36 (1954)

40. L.HÖRHAMMER und K.H.MÜLLER, Arch.Pharmaz. 287, 376 (1954)

41. L.HÖRHAMMER, H.WAGNER und F.GLOGGENGIEßER, Arch.Pharmaz.291, 126 (1958)

42. O.HOFFMANN in ENGLER-PRANTL, Die natürlichen Pflanzenfamilien IV, Leipzig 1897, p.183

43. H.A.HOPPE, Drogenkunde, Hamburg 1958

44. C.H.ICE and S.H.WENDER, J.Amer.Chem.Soc. 75, 50 (1953)

45. Z.I.JERZMANOWSKA and J.T.GRZYBOWSKA, Nature (London) 186, 807-808 (1960)

46. L.JURD, Arch.Biochem.and Biophys. 63, 376 (1956)

47. G.KLEIN, S.-B.Akad.Wiss.Wien,Math.-naturw.Kl.Abt.I, 129, 341 (1920)

48. G.KLEIN, S.-B.Akad.Wiss.Wien,130, 247 (1921)

49. W.LANG und K.SCHWANDT, Dtsch.Apotheker-Ztg. 97, 149 (1957)

50. L.MANFRED, Siete mil recetas botanicas a base de mil trescientas plantas medicinales, Buenos Aires 1958

51. G.H.MANSFIELD, Dr.T.SWAIN and C.G.NORDSTRÖM, Nature (London) 172, 23 (1953)

52. C.M.MOSER and A.I.KOHLENBERG, J.Chem.Soc. (London) 804 (1951)

53. K.MOTHES und H.KALA, Naturwissenschaften 42, 159 (1955)

54. R.NEU, Z.analyt.Chem. 151, 321 (1956)

55. R.NEU, Z.analyt.Chem. 153, 183 (1956)

56. R.NEU, Nature 182, 660 (1958)

57. C.G.NORDSTRÖM and T.SWAIN, Chem.and Ind.85 (1953)

58. C.G.NORDSTRÖM and T.SWAIN, Chem.and Ind. 823 (1953)

59. C.G.NORDSTRÖM and T.SWAIN, J.Chem.Soc.(London) 2764 (1953)

60. PAREYs Illustriertes Gartenbau-Lexikon, Berlin-Hamburg 1956

61. S.M.PARTRIDGE, with a note by R.G.WESTALL, Biochem.J.42, 238 (1948)

62. J.R.PRICE, J.Chem.Soc. (London) 1017 (1939)

63. B.PURI and T.R.SESHADRI, J.Chem.Soc.(London) 1589 (1955)

64. B.PURI and T.R.SESHADRI, J.Sci.Ind.Research 13 B,321 (1954)

65. L.REPPEL, Pharmazie 12, 654 (1957)

66. H.REZNIK und R.URBAN, Naturwissenschaften 44, 13 (1957)

67. H.REZNIK und R.URBAN, Naturwissenschaften 44, 592 (1957)

68. R.ROBINSON, The Structural Relations of Natural Products, Oxford 1955

69. A.ROSOLL, S.-B.Akad.Wiss.,Wien,Math.-naturw.Kl.,Abt.I, 89, 137 (1884)

70. M.SHIMOKORIYAMA and S.HATTORI, J.Amer.Chem.Soc.75, 1900 (1953)

71. J.SHINODA, J.pharmac.Soc.Japan 48, 214 (1928)

72. B.SKARZYNSKI, Biochem.Z. 301, 150 (1939)

73. A.SONN, Ber.dtsch.chem.Ges. 50, 1262 (1917)

74. F.ŠORM, Z.ČEKAN, V.HEROUT, H.RAŠKOVÁ, Chemické listy 46, 308 (1951)

75. T.SWAIN, Chem. and Ind. 1480 (1954)

76. E.STEINEGGER und O.HAHN, Scientia Pharmaceutica 21, 254 (1953)

77. E.STEINEGGER und A.BRANTSCHEN, Pharmac.Acta Helvetiae 34, 334 (1959)

78. K.VENKATARAMAN in L.ZECHMEISTER, Fortschritte der Chemie organ.Naturstoffe XVII, p.1, Wien 1959

79. J.VRKOČ, V.HEROUT und F.ŠORM, Collect.czechoslov.chem.Commun. 24, 3938 (1959)

80. H.WAGNER und W.KIRMAYER, Naturwissenschaften 44, 10:307 (1957)

81. F.WEYGAND und H.WENDT, Z.Naturforsch. 14b, 421 (1959)

L e b e n s l a u f

Am 17. Januar 1926 wurde ich als Sohn des Apothekers Rudolpho Emilio ALBRECHT und seiner Ehefrau Lydia geb. Sperb, in Pôrto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasilien, geboren.

Im Jahre 1933 trat ich in die Grundschule des Deutschen Hilfsvereins, die später Hindenburg-Schule genannt wurde, ein. Anschließend besuchte ich das Instituto Pôrto Alegre bis zum Jahre 1936, an dem ich die Aufnahmeprüfung für das Gymnasium bestand.

1937 trat ich in das "Ginásio Nossa Senhora do Rosário" ein, das ich fünf Jahre bis zum Gymnasialabschluß besuchte. Anschließend besuchte ich das Vor-Technikum der Staatlichen Schule Julio de Castilhos mit Erfolg und erhielt das Reifezeugnis.

Anfang 1945 bestand ich die Aufnahmeprüfung für das Pharmazeutische Studium an der Medizinischen Fakultät der Universität Pôrto Alegre. Inzwischen arbeitete ich auch in einer Apotheke. Im Dezember 1947 erhielt ich das Staatliche Apotheker-Diplom.

Anfang 1948 trat ich in die Firma meines Vaters ein, der sich inzwischen auf chemische Produkte spezialisierte. Anschließend praktizierte ich vier Monate im Laboratorium für Nahrungsmittelchemie des Staatlichen Gesundheitsamtes. Zu dieser Zeit wurde ich erstmalig aufgefordert, als Hilfsassistent an der Pharmazeutischen Fakultät der Universität Pôrto Alegre zu arbeiten.

Von August 1951 bis August 1953 gehörte ich zum Direktorium der Vereinigung der Apotheker und Chemiker von Rio Grande do Sul.

Ende 1952 nahm ich die Einladung des Herrn Professor Dr. Ennio M.VASCONCELLOS an und wurde Hilfsassistent für das Lehrfach Pharmazeutische Industrielle Chemie und ab März 1953 war ich sein Mitarbeiter.

Im Sommersemester 1957 erhielt ich vom Verband der Chemischen Industrie Deutschland ein Stipendium für 10 Monate und studierte an der Hamburger Universität Technische Chemie. Hier erhielt ich die unfaßbare Nachricht von der Universität Pôrto Alegre, daß ich zurückkehren müsse, um eine Prüfung abzulegen, um dort nicht die Assistentenstelle zu verlieren. Nach bestandener Prüfung als Hilfsassistent an der Universität Pôrto Alegre hatte ich vorerst noch geschäftliche Dinge abzuwickeln und kehrte Ende Oktober 1958 nach Deutschland zurück. Im Wintersemester 1958/59 arbeitete ich im Pharmazeutischen Institut der Freien Universität Berlin; im Sommersemester 1959 studierte ich Technische Chemie und Lebensmittelchemie an der Technischen Universität Berlin.

Da die Brasilianische Regierung mich aufforderte, phytochemische Untersuchungen durchzuführen, suchte ich Verbindung mit dem Institut für Pharmakognosie der Freien Universität Berlin, wo ich seit dem 1.11.1959 bei Herrn Professor Dr. R. HÄNSEL als Doktorand tätig war.

Druck: Arno Brynda, Berlin W 30